



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

**TIAGO ANDRÉ
MACHADO
RIBEIRO**

**BIOATIVIDADE DE PORTOAMIDAS EM
CÉLULAS DE CANCRO – MECANISMO
MOLECULAR**

**TIAGO ANDRÉ
MACHADO
RIBEIRO**

**BIOATIVIDADE DE PORTOAMIDAS EM
CÉLULAS DE CANCRO – MECANISMO
MOLECULAR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Ralph Urbatzka, Investigador no laboratório Blue Biotechnology and Ecotoxicology, CIIMAR, Doutor Pedro Nuno da Costa Leão, Investigador no laboratório Blue Biotechnology and Ecotoxicology, CIIMAR, Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino, Investigador Auxiliar Convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Trabalho parcialmente financiado pelo Projecto MARBIOTECH (referência NORTE-07-0124-FEDER-000047) enquadrado no Programa Integrado de IC&DT MARVALOR - Building research and innovation capacity for improved management and valorization of marine resources, suportado pelo Programa Operacional Regional do Norte (ON.2 – O Novo Norte) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar na Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria do Rosário Fidalgo Martins
Professor adjunto da Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto.

Doutor Ralph Urbatzka
Investigador no laboratório Blue Biotechnology and Ecotoxicology (CIIMAR)

agradecimentos

Gostaria de agradecer todas as pessoas que intervieram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Ao Dr. Ralph Urbatzka por ter permitido a realização deste trabalho, bem como pela sua orientação.

Ao Dr. Pedro e ao Dr. Alexandre por todo o apoio dado, sugestões e disponibilidade sempre demonstrados.

Ao Dr. Rui Vitorino pelo apoio prestado na realização do trabalho.

Ao Marco e a Joana pelo apoio dado quando necessário.

À Filipa pelo trabalho desenvolvido em conjunto, e pelo apoio sempre prestado.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecotoxicologia, Genómico e Evolução pelo apoio e boa disposição sempre presentes.

palavras-chave

Apoptose, Portoamidas, HT-29, Cancro, citotoxicidade.

resumo

Os compostos de origem marinha apresentam extrema importância para a comunidade científica em resultado do seu potencial farmacológico. Alguns compostos marinhos levaram a criação de fármacos, sendo utilizados nas mais variadas áreas da saúde.

As portoamidas são moléculas, recentemente isoladas e caracterizadas, que interagem com outros microorganismos presentes no ambiente, num fenómeno chamado de alelopatia. Contudo, foi também observado, efeito citotóxico sobre a linha celular de cancro do pulmão H460, sem conhecimento do mecanismo envolvido. Assim procurou-se analisar 1) citotoxicidade em várias linhas celulares e 2) o mecanismo molecular envolvido na citotoxicidade observada. Para este fim, analisou-se a apoptose, alterações morfológicas e a proteómica.

Diferentes linhas celulares cancerígenas foram expostas a um gradiente de concentrações de portoamidas, tendo sido visível um diferente efeito citotóxico sobre diferentes linhas celulares, o que pressupõe um mecanismo molecular de citotoxicidade diferente.

Foram analisadas alterações morfológicas, provocadas por exposição a portoamidas, de duas linhas celulares, MG-63 e HT-29, recorrendo a técnicas de microscopia de fluorescência. Foram evidenciadas alterações morfológicas na linha MG-63, enquanto não foi observadas alterações na linha HT-29.

A análise da linha HT-29, linha com uma forte resposta dependente da dose, após exposição a portoamidas, recorrendo a técnicas proteómicas, revelou alterações no proteoma. Verificou-se sobre-expressão de proteínas ligadas à apoptose, organização mitocondrial e processos de sinalização. A análise da variação das proteínas expressas permitiu identificar uma ativação da via intrínseca da apoptose, associado também à via extrínseca.

Em suma, portoamidas parecem ser um interessante candidato para mais investigação da sua ação molecular sobre células cancerígenas do colon.

Após este projecto, uma análise genómica, ao nível da expressão de genes identificados, seria uma forma de compreender melhor o mecanismo molecular envolvido na citotoxicidade provocada por portoamidas.

keywords

Apoptosis, portoamides, HT-29, Cancer, cytotoxicity

abstract

The marine compounds reveal huge importance to the scientific community in result of its pharmacology potential. Some compounds were the basis of some drugs, being used in a lot of clinical areas.

The portoamides are molecules produced by cyanobacteria, recently isolated and characterized, that interact with other microorganisms in the environment, in a process called alelopathy. Previously a cytotoxic effect was observed in the lung cancer cell line H460, without any idea about the mechanism involved. Having the idea about alterations in the cell cycle that cancer cells have, in specific in the apoptosis, this study tried to identify some of the molecular mechanisms behind the portoamides' cytotoxicity.

Different cancer cell lines were exposed to a concentration gradient of portoamides and a selective cytotoxic effect was observed in different cell lines – allowing the speculation of different underlying molecular mechanisms.

Morphological alterations of the cell lines caused by exposure to portoamides, in the cell lines MG-63 and HT-29, were analyzed using fluorescence microscopy techniques. Alterations were observed in MG-63 cells but not in the HT-29 cells.

HT-29 cells were selected for further analysis using proteomics since a strong dose-dependent response was observed after exposure to portoamides. The over expression of proteins were seen of proteins involved in the apoptosis, mitochondrial organization and signaling mechanisms. The analysis of the expressed proteins show the activation of the intrinsic pathway of apoptosis, but also the extrinsic pathway. In summary, portoamides seems to be a very interesting candidate for futher elaboration of their molecular mode of action in colon cancer cells.

After this project, a genomic approach, about the expression level of some identified genes, would be a good way to a better understanding of the molecular mechanism involved in the cytotoxicity caused by portoamides

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Produtos naturais e descoberta de fármacos de origem marinha	2
1.2 - CIANOBACTÉRIAS	3
1.2.1 - Classificação e relevância científica.....	3
1.2.2 – Vias de síntese dos metabolitos secundários produzidos por cianobactérias	6
1.2.2.1 – Portoamidas produzidas por <i>Oscillatoria</i> sp. (LEGE 05292)	7
1.3 – O Cancro: sua relevância científica e marcas características	9
1.3.1 - Regulação do ciclo celular e principais alterações em células cancerígenas	11
1.3.2 – Apoptose e alterações evidenciadas no cancro	13
1.4 - Abordagem experimental utilizada para compreensão da ação de portoamidas isoladas de <i>Oscillatoria</i> sp. sobre diferentes linhagens de células cancerígenas	17
2 – MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 – Crescimento de <i>Oscillatoria</i> sp. LEGE 05292 para obtenção de portoamidas	21
2.1.1 - Crescimento em larga escala de <i>Oscillatoria</i> sp. LEGE 05292	21
2.1.2 - Isolamento das portoamidas produzidas por <i>Oscillatoria</i> sp. (LEGE 05292).....	21
2.1.3- Purificação e Análise qualitativa das portoamidas A e B por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associado a detetor PDA (HPLC-PDA)	21
2.1.4 - Monitorização da mistura da portoamida A+B por Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa (LC-MS)	22
2.2 - Culturas celulares e manutenção	23
2.2.1 - Culturas celulares e meios de crescimento	23
2.2.2 - Manutenção das culturas celulares	24
2.3 – Ensaios de viabilidade celular por MTT.....	25
2.3.1- Ensaio de MTT nas diferentes linhas celulares quando expostas a portoamidas e DMSO	25
2.3.2 - Avaliação da morfologia celular na apoptose por microscopia de fluorescência.	26

2.3.3 - Análise estatística dos resultados dos ensaios de MTT bem como dos dados obtidos pelo <i>CellProfiler</i>	27
2.4 - Ensaio de exposição de HT-29 a portoamidas	27
2.5- Extração proteica da linha celular HT-29 após exposição a portoamidas.....	28
2.6 – Abordagem proteómica para avaliação das alterações proteicas de HT-29 após exposição a portoamidas.....	29
2.6.1 - Electroforese bidimensional das células da linha HT-29 após exposição a portoamidas.....	29
2.6.2 - Fixação e Coloração dos géis de poliacrilamida dos extractos proteicos das células da linha HT-29.....	30
2.6.3 - Análise proteómica dos géis de poliacrilamida dos extratos proteicos das células da linha HT-29	31
2.6.4 - Preparação das proteínas extraída de HT-29 expostas a portoamidas para a realização de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)	31
2.6.5 - Identificação das proteínas por MALDI-TOF	32
3-RESULTADOS	34
3.1 – Purificação e isolamento de portoamidas a partir de <i>Oscillatoria</i> sp. (LEGE 05292)34	
3.1.1 - Purificação e Análise qualitativa de Portoamida A e B por HPLC-PDA.....	34
3.1.2- Monitorização da mistura da portoamida A+B por Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa (LC-MS)	36
3.2 – Ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade de portoamidas sobre as linhas celulares cancerígenas	39
3.2.1 - Ensaio de MTT com exposição a DMSO para avaliação da citotoxicidade do composto sobre as linhas celulares MG-63, HT-29, A549 e SH-SY5Y.....	39
3.2.2 - Ensaio de MTT para as linhas celulares A549, T-47D, SH-SY5Y, HepG2, MG-63, RKO e HT-29 após exposição a portoamidas.....	40
3.3 - Análise de alterações morfológicas após exposição da linha A549 a Camptotencina e das linhas MG-63 e HT-29 a portoamidas, recorrendo a microscopia de fluorescência.....	46

3.3.1 – Exposição de A549 a camptotencina	48
3.3.2 - Exposição de MG-63 a portoamidas	51
3.3.3 - Exposição de HT-29 a portoamidas	53
3.4 – Abordagem proteômica para avaliação da citotoxicidade de portoamidas sobre HT-29	56
3.4.1 - Extração Proteica da linha HT-29, segundo o protocolo descrito, após exposição a portoamidas.....	56
3.4.2 - Electroforese Bidimensional dos extratos proteicos obtidos a partir das células da linha HT-29 expostas a portoamidas.....	57
3.5 - Identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF	60
4 - DISCUSSÃO	66
4.1 - Padrão de citotoxicidade de portoamidas sobre diferentes linhas cancerígenas	66
4.2 - Alterações da Morfologia Celular visíveis por microscopia de fluorescência após exposição a camptotencina e portoamidas.....	68
4.2.1 - Exposição de 549 a camptotencina.....	68
4.2.2 – Exposição de MG-63 e HT-29 a portoamidas	68
4.3 – Expressão diferencial de proteínas de HT-29 após exposição a portoamidas	69
4.5 – Conclusões.....	73
4.4 – Prespectivas Futuras	74
5 - BIBLIOGRAFIA.....	75
6 - ANEXOS	83
ANEXO I	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Oscillatoria</i> sp. LEGE 05292	6
Figura 2 - Estrutura de uma portoamida.....	7
Figura 3 - Fases do ciclo celular e principais CDK e ciclinas por fase.....	11
Figura 4 - Mecanismo da ativação da apoptose pela via intrínseca	14
Figura 5 - Interação do Fas com o seu receptor FasL.....	15
Figura 6 - Imagem obtida por microscopia óptica da linha HT-29	23
Figura 7 - Espectro de Absorção da fração E	34
Figura 8 – Espectros PDA da portoamida A e B.....	35
Figura 9 - Cromatograma TIC (Total Ion Chromatogram).	36
Figura 10 - Cromatograma XIC (Extracted Ion Chromatogram) para a portoamida A	37
Figura 11 - Cromatograma XIC (Extracted Ion Chromatogram) para a portoamida B	38
Figura 12 - Espectros de Massa ESI.....	39
Figura 13 - Média das absorvâncias em função da percentagem de DMSO	40
Figura 14 – Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha A549.	41
Figura 15 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular MG-63.	42
Figura 16 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular RKO.....	43
Figura 17 - Gráfico da variação da viabilidade celular (em percentagem) em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular RKO.	43
Figura 18 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular HT-29.	44
Figura 19 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular HT-29.	45
Figura 20 - Reconhecimento do núcleo (A), citoplasma (B), células (C) e contorno celular (D) pelo CellProfiler 2.0.1	46
Figura 21 –Reconhecimento do núcleo (A), avaliação dos núcleos condensados (B) e avaliação da intensidade dos núcleos (D) pelo CellProfiler 2.0.1.	47

Figura 22 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha A549 após exposição a camptotecina, numa concentração de 10 μ M.	48
Figura 23 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e tratamentos com camptotecina, nas concentrações de 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha A549.....	48
Figura 24 - Representação gráfica da média do perímetro do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e camptotecina, nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, referente à linha A549.	49
Figura 25 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e camptotecina 5 μ M e 10 μ M, , referente à linha A549	50
Figura 26 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha MG-63 após exposição a portoamidas, numa concentração de 1,25 μ g/mL.....	51
Figura 27 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha MG-63	51
Figura 28 - Representação gráfica da média do perímetro do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha MG-63.	52
Figura 29 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e portoamidas 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha MG-63.....	53
Figura 30 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha HT-29 após exposição a portoamidas, numa concentração de 10 μ g/mL.....	53
Figura 31 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha HT-29.....	54
Figura 32 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 μ g/mL e 10 μ g/mL, referente à linha HT-29.....	55

Figura 33 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e portoamidas 1,25 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha HT-29.....	55
Figura 34 - Géis de poliacrilamida (12,5%) realizados para o extratos proteicos de HT-29 expostas a portoamidas.....	57
Figura 35 – Exemplo para uma proteína da sua intensidade relativa no grupo controlo e nos dois tratamentos.	60
Figura 36 – Distribuição das proteínas de HT-29, identificadas por MALDI-TOF/TOF, consoante o processo biológico em que se encontram envolvidas.....	63
Figura 37 – Interações evidenciadas por algumas das proteínas identificadas de HT-29 por MALDI-TOF/TOF	64

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Indicação da linha celular	23
Tabela 2 - Tabela de valores de CI50 (µg/mL) para cada linha em estudo.	45
Tabela 3 - Concentração de proteína obtida de cada uma das amostras de células da linha HT-29 expostas a portoamidas.	56
Tabela 4 - Intensidade relativa das proteínas diferencialmente expressas na linha celular HT-29, detetadas por eletroforese bidimensional e pelo software PDQuest	57
Tabela 5 – Identificação das proteínas, diferencialmente expressas entre controlo e tratamentos, pela técnica de MALDI-TOF/TOF.	60

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A549: Linha celular de carcinoma pulmonar
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análise de variância de um valor
APS: *Amonium Persulfate*
ATP: Adenosina Trifosfato
ATCC: Coleção de culturas do tipo Americanas
CDK: Cínase depende da ciclina (*Cyclin-dependent Kinase*)
CDKI: Inibidor da CDK (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*)
CAK: Cínase ativadora da CDK (*CDK-activating kinase*)
CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propano sulfato
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagles Medium*
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
EMA: *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)
MEM: *Eagle's Minimum Essential Medium*
EUA: Estados Unidos da América
FBS: Soro fetal bovino
FDA: *U.S Food and Drug Administration*
HAM's: *F12 Nutrient Mixture*
HepG2: Linha celular de carcinoma hepatocelular
HO-33342: *Hoechst 33342*, BisBenzimida
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*)
HT-29: Linha celular de adenocarcinoma colo-rectal
LA: Laranja de Acridina
LDH: Lactato desidrogenase
MG-63: Linha celular de osteossarcoma
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OMS: Organização Mundial de Saúde
PBS: Tampão fosfato salino
PI: Iodeto de Propídeo
T-47D: Linha celular de carcinoma ductal
VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial
RKO: Linha celular de carcinoma do cólon
RMN: Ressonância magnética nuclear
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*
TEMED: *N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine*

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Produtos naturais e descoberta de fármacos de origem marinha

O potencial farmacológico da biodiversidade marinha é muito alto, sendo, concretamente na área da oncologia, de elevada importância [1]. Para além do valor económico que os compostos marinhos podem apresentar, é possível prever a existência de um grande número de compostos a serem descobertos, demonstrando a importância da investigação da biologia marinha [1]. São variadas as origens que estes compostos apresentam, desde origem animal, como as filos *Chordata* ou *Mollusca*, por exemplo, até, a uma origem microbiana, onde se encontram as cianobactérias em estudo neste trabalho [2].

São variados os compostos marinhos que evidenciam um importante papel como fármacos utilizados na área da clínica, sendo usados no tratamento de variadas patologias [3]. O primeiro fármaco com origem marinha, a ser aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA), instituição que supervisiona a comercialização de qualquer novo alimento, medicamento, ou outra substância química nos EUA, foi o Prialt prescrito para a dor crónica [3]. Um dos principais aspetos demonstrados por este composto, evidenciando a enorme potencialidade dos organismos marinhos, é que este tem origem a partir do veneno proveniente de gastrópodes do género *Conus*, sendo estes produtores de uma enorme quantidade de toxinas, nomeadamente conotoxinas. Estas últimas têm como alvo de ação o sistema nervoso central das presas dos gastrópodes, referidos anteriormente, resultando no bloqueio dos sinais nervosos, por bloqueamento dos canais de cálcio [3]. A partir deste composto foi desenvolvido um derivado sintético, o ziconitide, tendo sido utilizado na composição do fármaco. Esta descoberta, após vários anos de investigação da comunidade científica, foi a abertura de uma porta que possibilitou a descoberta de uma grande quantidade de compostos com aplicações na área da clínica (revisto em [3,4]).

São variadas as aplicações clínicas dos fármacos sintetizados a partir de compostos de origem marinha, sendo uma das de maior investigação a sua ação como anti-cancerígenos. O primeiro composto que foi aprovado tanto na Europa pela *Agência de Medicina Europeia* (EMA) como nos EUA pela FDA, para o tratamento do cancro, foi o Cytarabine, composto com origem numa esponja marinha (*Cryptotethia crypta*), sendo a sua estrutura um nucleósido com um açúcar modificado [4]. O seu mecanismo de ação baseia-se na

inibição da DNA polimerase, sendo utilizado em casos de leucemia em crianças. Um outro fármaco de importante relevância, aprovado na Europa para distribuição, mas ainda sem se encontrar em comercialização nos Estados Unidos, é o Trabectedin, uma tetrahydroisoquinolona alcaloide, sendo a sua origem um composto alcalóide, o *ecteinascidins*, libertado por um invertebrado marinho de águas tropicais, o *Ecteinascidia turbinata* [4]. O mecanismo de ação do fármaco baseia-se na modificação covalente do ácido desoxirribonucleico (ADN) por uma alquilação específica de uma guanina na posição N2 [3]. Inicialmente este composto mostrava-se tóxico contra linhas de células leucémicas, contudo, estudos *in vivo*, mostraram que o composto é também efetivo contra uma grande gama de outros tipos de cancro, sendo utilizado atualmente no tratamento do cancro do ovário.

A descoberta destes compostos, com variadas aplicações clínicas, alertou a comunidade científica para as grandes potencialidades que os compostos marinhos apresentam, concretamente no desenvolvimento de fármacos com uso terapêutico. Associado a este fato, a investigação na oncologia apresenta importante relevância para a comunidade científica, em resultado das alterações que as células cancerígenas apresentam relativamente às células normais de um organismo (revisto em [5]). A necessidade de procurar novos tratamentos, mais eficazes e com menos sequelas para o paciente, é algo que impulsiona a própria investigação [6], sendo que os organismos marinhos podem surgir com tratamentos que preenchem estes requisitos.

1.2 - CIANOBACTÉRIAS

1.2.1 - Classificação e relevância científica

As cianobactérias pertencem ao domínio das bactérias, apresentando uma estrutura de *gram-negativo* na disposição da sua parede celular, utilizando o processo de fotossíntese, sendo por isso organismos autotróficos (revisto em [7]). São também organismos com uma grande capacidade de adaptação, recorrendo a outros processos para garantir a sua sobrevivência, tais como fixação do azoto ou formação de simbioses com outros organismos presentes no seu ecossistema, plantas e fungos por exemplo (revisto em [8]). As cianobactérias apresentam um papel central nos ecossistemas, na circulação de

nutrientes, concretamente no fluxo de azoto, sendo os organismos que se encontram no início da cadeia alimentar [9].

As cianobactérias são divididas em 5 grandes ordens, Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales, apresentando, cada uma, um elevado número de espécies constitutivas (revisto em [8]).

As cianobactérias são produtoras de vários metabolitos, apresentando estes uma vasta gama de aplicações, desde industrial até à clínica, como visível pelo grande número de publicações envolvendo este assunto [10–12]. De seguida são referidos alguns exemplos de aplicações das cianobactérias, reforçando a importância do seu estudo.

Por exemplo, dentro da área da indústria, compostos como poli- β -hidroxibutirato, apresentam um importante papel na preservação do meio ambiente, com a diminuição da produção de plásticos com origem petroquímica. Este composto, é um elemento de reserva de algumas cianobactérias, substituindo com eficiência os plásticos de origem petroquímica, com a vantagem de serem biodegradáveis. Associado a isto evidenciam níveis de resistência e termocapacidade semelhantes aos plásticos normalmente utilizados pelo Homem, o que garante, assim, a capacidade de poderem ser usados da mesma maneira [12].

No estudo demonstrado em [10] é-nos demonstrado o possível poder anticancerígeno que o pigmento natural C-ficocianina, isolado de uma cultura de *Oscillatoria tenuis*, pode apresentar. Neste estudo verifica-se que, o pigmento em questão, atividade antioxidante e inibitória do crescimento sobre células cancerígenas de origem humana, concretamente uma linhagem de cancro colon-rectal (HT-29) e de cancro do pulmão (A549). Esta atividade é evidenciada tanto pela indução da apoptose nuclear, inibida em células cancerígenas, bem como na paragem no ciclo celular na transição da fase G_0 para G_1 , impedindo que as células amadureçam e se multipliquem, associado à fragmentação do ADN, uma marca de células não viáveis.

Num outro estudo ilustrado por [11] é demonstrado o carácter citotóxico apresentado por um conjunto de ciclodepsipéptidos, denominados de veraguamidas. Estes compostos foram isolados a partir de uma coleção de *Oscillatoria margaritifera*, cianobactéria da da ordem Oscillatoriales, sendo que uma forma estudada de veraguamida apresenta alta

citotoxicidade para uma linha de células de cancro de pulmão humano (H460), com uma DL_{50} de 141 nM.

As aplicações anteriormente referidas, são alguns exemplos das aplicações destes compostos, sendo também utilizados em outras patologias como as doenças neurodegenerativas, as doenças infecciosas, tratamento do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), desenvolvimento de analgésicos ou tratamento de processos inflamatórios (revisto em [7,13]). O mecanismo de ação, apresentado por estes compostos, varia consoante a estrutura celular que é seu alvo, sendo um dos seus principais efeitos a inibição de alguns processos celulares. Alguns dos processos inibidos são: 1) a mobilidade dos microtúbulos, importantes no citoesqueleto celular; 2) mobilidade dos filamentos de actina, responsáveis por movimentos celulares e musculares; 3) ação das histonas deacetilases, que controlam o processo de transcrição; 4) inativação do proteassoma, responsável pela degradação de proteínas ubiquitinadas e não funcionais a nível celular [13]. Muitos destes compostos são usados como fármacos líder para o desenvolvimento de análogos, em resultado do seu efeito celular, originando fármacos com maior eficiência que o composto inicial, sendo em alguns casos mais eficientes que outros fármacos já existentes (revisto em ([7])).

Grande parte dos compostos referidos anteriormente são metabolitos secundários, pois são compostos que não são estritamente essenciais para a sobrevivência das espécies em causa, mas que interferem tanto com outros organismos, bem como com o meio ambiente em que estes se encontram [14]. Este tipo de compostos existe numa enorme variedade, num total superior a 80 unidades estruturais diferentes, sendo que, por exemplo, foram já identificados mais de 300 alcaloides de origem marinha (revisto em [7]). Para além disto, uma única espécie de cianobactéria consegue apresentar uma alta capacidade de produção de metabolitos, com produção de compostos estruturalmente diferentes. Este fato resulta da ação de enzimas de formas diferentes, em virtude de diferentes vias de síntese conduzirem á produção de compostos diferentes (revisto em [15]). A maioria dos compostos isolados até aos dias de hoje, provêm das ordens *Oscillatoriales* e *Nostocales*, contudo este facto não se deve a maior produção de metabolitos destas espécies, mas sim, à grande disponibilidade de biomassa que estes géneros apresentam em resultado do alto crescimento que apresentam nos ecossistemas de onde são recolhidos (revisto em [16]).

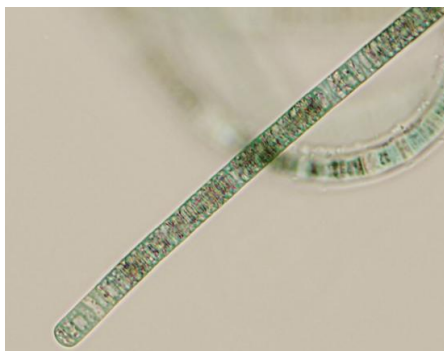


Figura 1 – *Oscillatoria* sp. LEGE 05292 (ampliação 400×)

De entre a grande gama de cianobactérias que existem, no presente trabalho irá ser estudado uma cianobactéria do género *Oscillatoria* (nome resultante do seu movimento oscilante na água), proveniente da ordem *Oscillatoriales*, sendo a figura 1 um exemplo de uma cianobactéria deste género. Os membros deste

grupo são cianobactérias filamentosas em que as colónias resultam de aglomerados de filamentos que

se direccionam para a fonte de luz de forma a exponenciar o seu crescimento [17]. Este género de cianobactéria já foi largamente estudado na comunidade científica, ao nível dos mais variados campos, tanto em possíveis interações apresentadas em comunidades microbianas bem como sobre outras células em crescimento [2,17]. Em linha com o que já foi referido anteriormente, um dos principais mecanismos em que os metabolitos secundários desempenham um importante papel, é no fenómeno da alelopatia, ou seja, na interferência no crescimento de proliferação de outras espécies no ambiente circundante, influenciando a maneira como certos ecossistemas evoluem ao longo no tempo, quando na presença destes compostos [18]. Desta forma pode-se fazer uma inferência de que estes compostos, e concretamente os produzidos por *Oscillatoria* sp. poderão ter também uma ação sobre linhas de origem humana, podendo influenciar o seu próprio crescimento e proliferação.

1.2.2 – Vias de síntese dos metabolitos secundários produzidos por cianobactérias

As cianobactérias, onde se englobam as do género filamentosas, como o caso de *Oscillatoria*, são produtoras de um grande número de compostos, que, na sua maioria, são moléculas com azoto, derivadas de aminoácidos e péptidos [2]. Estes compostos produzidos apresentam variadas funções, sendo que, um dos seus possíveis papéis, ao nível dos ecossistemas, é de proteção contra outros microrganismos, através de um fenómeno denominado de alelopatia, como referido anteriormente. Nestas situações, estes metabolitos exercem um efeito inibitório sobre outras espécies, funcionando como uma vantagem adaptativa para o organismo que produz estes compostos [19].

A síntese dos metabolitos secundários de origem cianobacteriana tem, na sua maioria, origem em dois processos de síntese: *Nonribosomal peptide synthetase* (NRPS) ou *polyketide synthase* (PKS) [16]. O primeiro tipo de síntese, NRPS, ocorre a nível proteico sem intervenção de ácidos nucleicos, por condensação de aminoácidos com grupos carboxilo alvo, sendo controlado por um domínio catalítico associado a domínios de adenilação, tilação e condensação, para ativação, transferência e condensação dos aminoácidos, respetivamente [16]. A síntese PKS baseia-se num processo muito semelhante á síntese de ácidos gordos, traduzindo-se na condensação sequencial de grupos acil a uma cadeia carbonada que vai crescendo ao longo deste processo de biossíntese, sendo a enzima envolvida, a PKS, constituída por um conjunto de multi-domínios, como a cetoacil sintetase, domínios cruciais no mecanismo (revisto em [20]). Estes mecanismos possibilitam uma produção elevada de metabolitos, com variações ao nível estrutural e com diferentes efeitos no organismo e aplicabilidades [2]. São variadas as classes de péptidos produzidos, desde microcistinas, microgininas, e, por exemplo, a classe das ciclâmidas onde se encontram as portoamidas produzidas por *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292) (revisto em [16]).

1.2.2.1 – Portoamidas produzidas por *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292)

Um tipo de compostos produzidos pelas cianobactérias são as portoamidas [2], em estudo neste trabalho. A figura 2 é um exemplo da estrutura de um composto produzido por *Oscillatoria* sp. LEGE 05292, uma portoamida isolada a partir de culturas em crescimento da cianobactéria OSC., segundo o procedimento experimental descrito em (2).

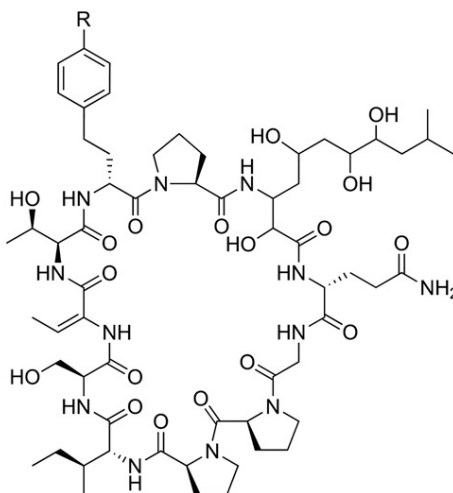


Figura 2 - Estrutura de uma portoamida isolada a partir de *Oscillatoria* sp [2].

As cianobactérias do género *Oscillatoria* são produtoras de uma variedade de compostos que liberta para o meio, contudo dentro destes, é dado destaque nesta monografia ao papel citotóxico das portoamidas produzidas por esta espécie [2].

As portoamidas foram caracterizadas e purificadas num estudo anterior [2], tendo sido caracterizados 4 metabolitos diferentes. A extração dos compostos foi realizada a partir de uma estirpe da cianobactéria em estudo *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292) (OSC), utilizando técnicas de cromatografia de fase normal para a obtenção dos compostos, seguida de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de fase reversa para a purificação dos mesmos [2]. Estes 4 compostos apresentam características estruturais que podem ser interpretadas como uma combinação de outras famílias de produtos naturais cianobacterianos, como “schytrozin A”, “pahayokolides” e “tychonamides”. Os compostos pahayokolides A e B foram já estudados na comunidade científica sendo a sua estrutura conhecida composta por elementos característicos, tais como N-acetil-N-metil-leucina, *E* e *Z*-dehidrobutirina, uma homofenilalanina e um aminoácido raro de origem numa síntese híbrida PKS-NRPS [21]. Os compostos de maiores dimensões são, de uma forma generalizada, dodecapéptidos com um anel de 11 carbonos, cujo N terminal apresenta um aminoácido duplamente modificado. Este aminoácido encontra-se ligado á cadeia lateral de um β -aminoácido através de uma ligação éster. A estrutura de duas das portoamidas combina uma secção das tychonamides, concretamente do α -aminoácido presente na parte cíclica, com outra secção identificada tanto na schyzotrin A como no género pahayokolides, um β -aminoácido presente, que é denominado de Aound. As outras duas portoamidas são análogos não esterificados dos dois compostos anteriores com falta de uma porção N-Ac-N-MeTyr, em ambos os casos.

Um outro aspeto evidenciado pelas portoamidas isoladas, e que foi estudado no trabalho anteriormente referido é sua capacidade alelopática, ou seja, estes metabolitos influenciam o crescimento de outras espécies biológicas presentes no ambiente em que se encontram [19]. Foi evidenciado, que a mistura das duas portoamidas mais abundantes, inibiu o crescimento da microalga verde *Chlorella vulgaris* [2].

Esta capacidade de interferência com o normal crescimento de outras células também se transporta, como já referido, para a citotoxicidade das portoamidas sobre a linha celular de cancro do pulmão H460. A conjugação de duas portoamidas, portoamida A e B, resultou

num efeito citotóxico muito superior ao efeito das duas portoamidas isoladas, cerca de 10 vezes maior. A conjugação das duas apresentou uma CI_{50} de 0,17 $\mu\text{g/mL}$, enquanto para as portoamidas A e B, isoladas, se verificaram CI_{50} de 4,08 e 1,92 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente [2].

1.3 – O Cancro: sua relevância científica e marcas características

Após a anterior exposição sobre as cianobactérias e seus metabolitos torna-se importante compreender o conceito do cancro e a sua relevância tanto a nível científico, assim como para a sociedade em geral, em resultado do impacto do mesmo na atualidade.

O cancro sempre representou para a comunidade científica uma área de investigação de grande interesse, tanto em resultado da elevada taxa de mortalidade que verifica a nível mundial [22], bem como na necessidade da procura de um possível tratamento. A disseminação da patologia a nível mundial, como evidenciado no estudo GLOBOCAN 2008, estima que, só no ano de 2008, 12,7 milhões de casos envolvendo o desenvolvimento de um carcinoma foram identificados, tendo ocorrido, dos mesmos, 7,6 milhões de mortes [6]. Este número alarmante, não só de casos identificados, como de mortes, resulta do aumento exponencial que a sociedade atual verifica, associado a comportamentos de alto risco que podem conduzir ao desenvolvimento de um carcinoma, tais como o tabagismo, sendo estes especialmente evidentes nos denominados países desenvolvidos [22]. O surgimento de um cancro acarreta consigo altos danos para a saúde do paciente, pois o próprio tratamento utilizado, radioterapia e quimioterapia, consoante o caso, acaba por provocar danos secundários em todo o organismo, com diminuição da qualidade de vida do doente [23]. Em resultado das várias causas que podem conduzir ao desenvolvimento de um carcinoma, este pode afetar várias zonas do organismo, resultando numa enorme variedade de carcinomas que afetam o Homem nos dias de hoje. De entre os variados tipos de cancro existentes, tendo por base o número de casos e de mortes a nível mundial, é importante destacar, o cancro do pulmão, o cancro da mama, cancro colo-rectal, cancro do fígado e cancro do estômago [24–26]. Contudo toda a forma de cancro é de importante investigação, não existindo uma distribuição específica de cada tipo de cancro no Mundo, havendo sim uma incidência de casos reportados por todo o planeta, desde regiões menos desenvolvidas aos países com maior taxa de desenvolvimento [6].

É importante, mediante o alto impacto que este conceito apresenta para a sociedade, compreender de que forma estas estruturas se formam e como se proliferam. Um dos primeiros estudos sobre o metabolismo de células cancerígenas remonta aos anos 50 do século XX, quando Otto Warburg evidenciou que estas células consumiam altas quantidades de glucose, produzindo altos níveis de lactato, mesmo em condições de aerobiose, no denominado efeito de Warburg [27]. Como é sabido as células normais do nosso organismo utilizam, preferencialmente, para maior obtenção de energia, ou seja, ATP, a fosforilação oxidativa a nível mitocondrial, com rendimento energético superior à fermentação láctica, utilizada pelas células cancerígenas, contudo, a utilização deste processo de produção de energia, é extremamente mais rápida [28]. Associado a isto e, como mostrado em alguns estudos, as células cancerígenas apresentam, em alguns casos, disfunções a nível mitocondrial, mesmo com produção de ATP a nível mitocondrial em quantidade considerável [29]. Assim, uma das alterações das células cancerígenas traduz-se em mudanças do metabolismo mitocondrial, com alterações da expressão dos principais componentes destes organelos [30].

Tendo por base os factos referidos anteriormente, existem certos mecanismos que podem ser vistos como marcadores da progressão de um cancro e que são característicos das suas células, entre os quais: 1) resistência á morte celular, ou seja, grande capacidade de resistência ao processo de apoptose, com capacidade de replicação de forma quase infinita e sem qualquer tipo de controlo ao nível do ciclo celular, por oposto às células normais do organismo, em que o mecanismo de sinalização assegura uma correta progressão no ciclo celular (revisto em [31]); 2) indução do processo de angiogénese, diretamente associado á progressão de vários tumores, sendo um marco central da formação de novos vasos a partir do local de disseminação onde se encontra o tumor inicial. Este fenómeno também está associado à secreção de fatores de invasão de tecidos por parte das células tumorais que irão conduzir a invasão de outras regiões do organismo, no fenómeno denominado de metastização [32].

Desta forma compreende-se que o metabolismo das células cancerígenas sofre alterações relativamente às células normais, tendo por base mudanças regulatórias ao nível do ciclo celular e de outros mecanismos diretamente associados a este, como a apoptose e a angiogénese, por exemplo [31]. Como referido verifica-se uma ausência de capacidade

regulatória por parte das células tumorais especialmente ao nível da morte celular, ou seja, ao nível da apoptose.

1.3.1 - Regulação do ciclo celular e principais alterações em células cancerígenas

A unidade básica da vida é a célula, sendo o seu metabolismo traduzido num ciclo com 4 fases principais: a fase G₀, denominada fase de quiescência, fase sem crescimento ou proliferação celular, seguida de três etapas de proliferação, com acumulação de variadas moléculas, denominadas de G₁, S e G₂, terminando na fase de divisão celular, a mitose (M), seguido, após formação das células filhas, de regresso á quiescência por parte das mesmas (revisto em [5]). Durante o ciclo celular existem várias moléculas com importante efeito regulatório, sendo um dos principais componentes regulatórios os complexos proteicos de serina/treonina, as CDK-ciclinas [33,34]. A figura 3 retrata as principais fases do ciclo celular e as principais CDK-ciclinas presentes em cada uma das fases do ciclo celular do ciclo celular, como descrito em [35].

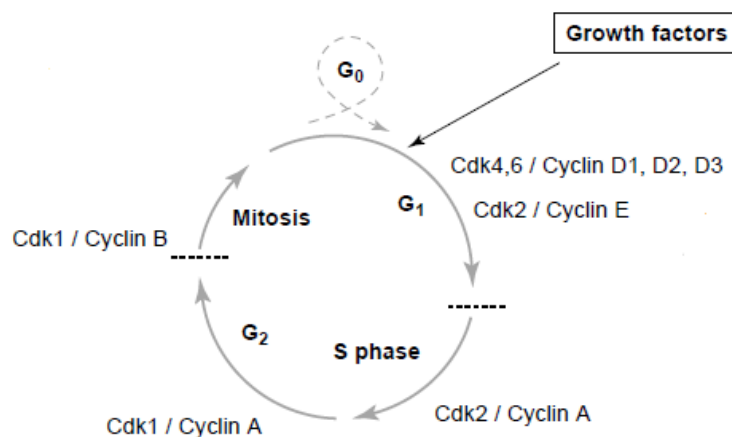


Figura 3 - Fases do ciclo celular e principais CDK e ciclinas por fase (adaptado de [35]).

Estes complexos proteicos são formados por uma subunidade regulatória, a ciclina e por uma subunidade catalítica, a cinase (CDK), sendo a sua regulação efetuada tanto por inibidores, denominados de inibidores da CDK (CDKI), como por processos de fosforilação (revisto em [34]). É sabido que as CDK 1, 2, 4 e 6, apresentam um papel direto na regulação do ciclo celular, assegurando a progressão do mesmo (revisto em [5]). A CDK4 e a CDK6 são as primeiras a entrar em ação sendo ativadas por ciclinas do tipo D [34]. Posteriormente os complexos de CDK2 – ciclina E asseguram a entrada na fase S do

ciclo celular, sendo posteriormente desativados, formando complexos CDK2 – ciclina A [5]. Na fase G2 a CKD1 encontra-se ligada a ciclinas do tipo A, contudo, para a progressão para a mitose é necessário que a CDK1 se ligue a ciclinas do tipo B [34].

Relativamente aos inibidores, estes efetuam a sua ação tanto por inibição direta sobre a CDK, bem como por ação sobre o complexo CDK-ciclina, controlando dessa forma a atividade do complexo (revisto em [33]). Os processos de fosforilação/desfosforilação também controlam a ativação do complexo CDK-ciclina, ocorrendo a fosforilação sobre os resíduos conservados de treonina presentes na CDK (revisto em [33]). A fosforilação é efetuada pela ação de um complexo denominado de cinase ativadora da CDK (CAK), sendo esta ativada por fosforilação da ciclina H (revisto em [5]). A ativação dos complexos de CDK-ciclina conduz á fosforilação de proteínas alvo, iniciando uma cascata de sinalização, sendo que este processo é regulado pelos níveis intra-celulares de ciclina (revisto em [33]).

Outro aspeto a ter em conta no controlo celular verifica-se ao nível dos denominados pontos de restrição, ou seja, transições entre as fases do ciclo, garantindo assim que as células-filhas sejam a cópia mais fiel da célula mãe [5]. O primeiro ponto é a entrada das células no ciclo celular, ficando, dessa forma, intimamente ligadas ao ciclo celular (revisto em [33]). A transição da fase G1 para a fase S é dependente da ação da proteína p53, na medida em que, danos no ADN conduzem a um rápido aumento da p53, levando a ativação de vários genes como o p21, que levam á produção de um inibidor da CDK, interrompendo o ciclo celular (revisto em [33]). Este controlo do dano, ao nível do material genético, também se verifica ao nível da fase G2 e consequente transição para a mitose, contudo não se encontra dependente da ação da p53, mas sim da inativação de uma forma da CDK, a CDK1 (revisto em [33]).

Tendo por base o que foi explorado até ao momento relativamente ao ciclo celular, pode-se fazer uma transposição para o tema em desenvolvimento, o cancro. Certas mutações que ocorram ao nível de proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, podem conduzir ao desenvolvimento do cancro, concretamente mutações nos genes que codificam as CDK, assim como dos genes que codificam os seus ativadores e inibidores (revisto em [33]). Uma das grandes marcas dos diferentes tipos de cancros é um aumento da expressão tanto

da CDK como das ciclinas, associado a uma perda total dos inibidores da CDK (CDKI), o que se reflete em progressão celular contínua e desregulada [5,33].

Mutações ao nível dos genes codificantes da CDK vão refletir-se ao nível das transições do ciclo celular em cada um dos diferentes *checkpoints*, sendo exemplos disto: 1) mutações ao nível da CDK1 alteram o controlo celular na transição da fase G2 para a mitose (revisto em [36]); 2) mutações nos genes que codificam as CDK4, 6 e 2 alteram a transição da fase G1 para a fase S (revisto em [5]). Um aumento da expressão do gene codificante das fosfatases da família Cdc24, ativadoras da CDK, conduz ao aumento da expressão desta proteína, ativando complexos CDK-ciclina de uma forma desregulada (revisto em [33]).

As ciclinas funcionam como ativadores das CDK [33,36], sendo que diminuições da ciclina D1, ativador da CDK4 e CDK6, conferem resistência ao processo de desenvolvimento tumoral, despoletado por certos oncogenes (revisto em [34]). Por outro lado o aumento da expressão de ciclinas é uma marca de vários tipos de cancros, sendo exemplos disso, o aumento da expressão da ciclina D nos cancros do pulmão, mama, estômago ou o aumento da ciclina A em no cancro do pulmão (revisto em [36]).

1.3.2 – Apoptose e alterações evidenciadas no cancro

Um dos principais papéis que a apoptose apresenta verifica-se na eliminação de células danificadas ou infetadas, tendo especial importância no impedimento da génese de um tumor a partir de células normais, e consequente proliferação no organismo através de metástases [37].

As células em apoptose, a nível morfológico, apresentam como principais marcas a condensação e fragmentação do núcleo [38], bem como alterações ao nível da morfologia da membrana celular e da permeabilidade mitocondrial (revisto em [39]). Desta forma torna-se importante compreender as alterações que, a nível celular, conduzem a estas modificações.

Existem duas vias principais para o processo apoptótico, a via intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial resulta de alguns estímulos que indicam dano celular, como hipoxia ou agentes citotóxicos, conduzindo á libertação do citocromo c da mitocôndria, com ativação da chamada via das caspases [37]. A via extrínseca ou controlada por recetor,

resulta na ligação de um ligando extracelular, FasL, por exemplo, ao chamado “recetor da morte”, como o Fas [40].

A regulação do processo da apoptose sofre a intervenção de variadas proteínas, sendo que estas apresentam papéis específicos ao nível do controlo da apoptose [41]. Proteínas como as caspases [42], proteínas envolvidas em interações entre ligando e seu recetor [43] e famílias de proteínas como as da BcL-2 [37] são de extrema importância na regulação do fenómeno da apoptose.

As caspases são um conjunto de proteases de cisteína muito importantes na regulação dos processos de apoptose, necrose e inflamação, sendo ativadas por clivagem, apresentando ação nas duas vias apoptóticas [44]. As caspases podem ser divididas em dois conjuntos, as caspases iniciadoras que são ativadas de forma a puderem ativar o outro conjunto, as chamadas caspases efetoras. Um exemplo disto mesmo, e tendo por base o processo de ativação da apoptose pela via mitocondrial, é que a caspase 9, funcionando como caspase iniciadora, quando é ativada, conduz à ativação das caspases 3 e 7 que são as efetoras neste processo (revisto em [42]), encontrando-se na figura 4 esquematizado o processo envolvido.

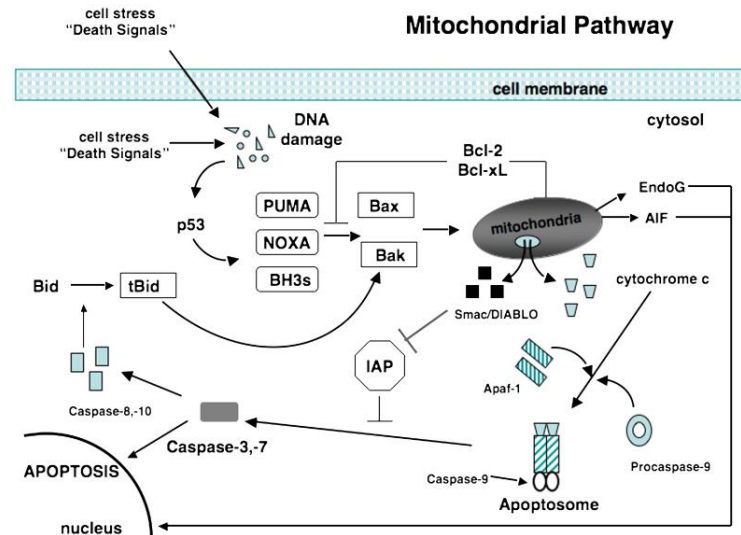


Figura 4 - Mecanismo da ativação da apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial, com destaque para o papel centra da caspase 9 como ativadora das caspases 3 e 7 (retirado de [39]).

Analizando ainda a figura 4, a ativação das caspases, especialmente da caspase 8, conduz também à clivagem e ativação da proteína Bid da família das Bcl-2, fazendo a ligação entre a via extrínseca e intrínseca (revisto em [42]).

Outro processo importante a ter em conta são interações ligando-recetor, que conduzem ao processo apoptótico pela via extrínseca, em resultado da capacidade que este sistema tem na manutenção da homeostasia do organismo. Um exemplo disto é a eliminação de células cancerígenas por ação de células T citotóxicas, em resultado da ativação pelo factor NF- κ B, sendo um importante passo no controlo da progressão do tumor [41]. A figura 5 representa a interação entre Fas e FasL, associados ao “domínio de morte”, com representação parcial da cascata de sinalização do processo de apoptose como descrito em [45].

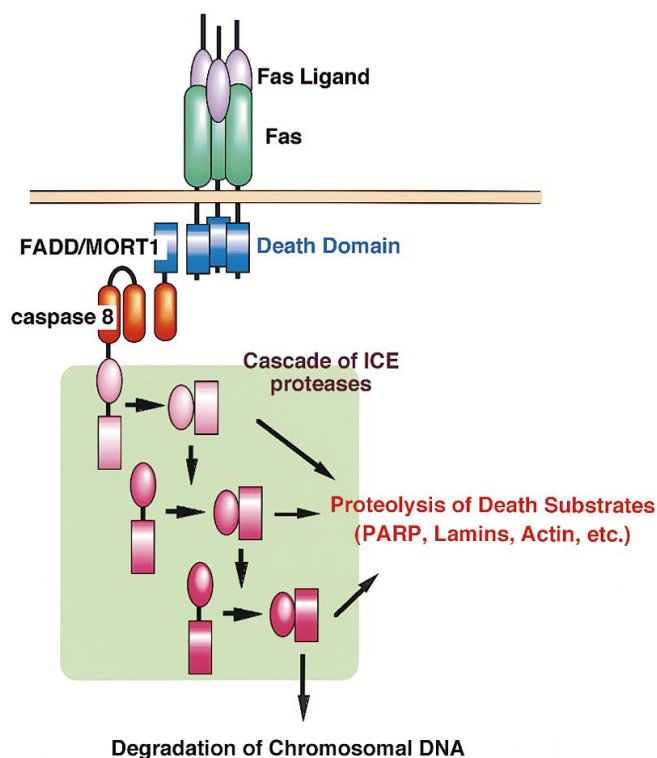


Figura 5 - Interação do Fas com o seu receptor FasL, com representação de parte da cascata de sinalização do processo de apoptose (adaptado de [45]).

O FasL é um recetor da família do TNF (*tumor necrosis factor*), sendo uma proteína membranar, apresentando uma forma solúvel funcional, na forma de um trímero, em semelhança com o TNF (revisto em [45]). Já o Fas, é uma proteína membranar, da mesma família do recetor do TNF, o TNFR (revisto em [45]). A interação Fas-FasL também interfere com outras moléculas, como por exemplo na ativação da caspase 8 que cliva a

proteína Bid numa forma denominada tBid que se transloca para a mitocôndria, provocando dano mitocondrial e amplificando sinal da entrada da célula em apoptose (revisto em [40]).

Outras moléculas apresentam um importante papel no fenómeno da apoptose, como é o caso da survivina, na livina, trombospondina, proteína p53, a CK2 e as proteínas da família Bcl-2. Estas moléculas funcionam como ativadores ou inibidores do processo de apoptose, como de seguida se demonstra.

A survivina e a livina, são duas proteínas inibidoras da apoptose, por inativação da cascata das caspases [46]. A survivina funciona como um fator chave da morte celular, encontrando-se tanto presente a nível nuclear como citoplasmático (revisto em [41]). Altas concentrações de survivina estão diretamente relacionadas com problemas na mitose e desregulações do ciclo celular, enquanto que a presença da livina em concentrações inferiores à survivina, ocorre em casos mais avançados de cancro (revisto em [46]).

A Trombospondina, proteína produzida em algumas células tumorais, facilita o reconhecimento e fagocitose de células em apoptose [46]. A trombospondina apresenta um importante papel na inibição de um processo característico do desenvolvimento tumoral, a angiogénese, pois a sua ligação a recetores inibitórios, presentes na membrana de células vasculares endoteliais inibe o processo (revisto em [31]).

A proteína p53, em células normais, apresenta uma concentração celular baixa, em resultado da sua rápida degradação por ubiquitinação ao nível do proteassoma [47], contudo em situações de stress celular, como dano do material genético, hipóxia ou ativações de oncogenes, verifica-se um aumento da expressão da p53. Este mecanismo funciona como uma defesa das células, podendo conduzir a uma variedade de situações, tais como paragem do ciclo celular, senescência, diferenciação, reparo do DNA, apoptose ou mesmo inibição da angiogénese [36]. A p53, funciona como um fator de transcrição, conduzindo à ativação de pelo menos 30 genes diferentes, sendo que o gene ativado e a resposta dada encontram-se diretamente relacionados com o tipo de estímulo que a célula sofre. Algumas das ações da proteína p53 são, por exemplo: 1) ação direta sobre o processo da apoptose, por aumento da expressão do gene *Bax*, cuja proteína sintetizada estimula a apoptose (revisto em [48]); 2) inibição do crescimento celular e reparo do material genético, por aumento da expressão de p21, proteína que evidencia esta dupla

capacidade regulatória (revisto em [36]); 3) inibição de inibidores da apoptose, sendo um exemplo disso de proteínas pro-apoptóticas da família das Bcl-2 (revisto em [47]). A proteína p53 apresenta uma função pro-apoptótica, aumentando a concentração de proteínas indutoras de apoptose e diminuindo a concentração das que inibem este fenómeno [47], conduzindo a que a sua ausência esteja diretamente relacionada com fenómenos de neoplasia e desenvolvimento tumoral. Outro dado importante é que mutações ao nível do gene que codifica a p53 está associada a formas de cancro mais agressivas e com taxas de sobrevivência dos doentes menores [47].

A proteína cinase CK2 é importante na supressão da apoptose, interagindo com outras proteínas inibidoras da apoptose (IAP), sendo que a sua diminuição conduz a diminuição das IAP levando á apoptose[49].

A família das proteínas *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) pode apresentar uma função pro-apoptótica no caso das Bax, BAK, Bcl-X, Bad, BiK, HrK e Bid [47] ou anti-apoptótica, como no caso das Bcl-xL, Mcl-1L e Bcl-W [24]. Relativamente às proteínas Bcl-2 com função pro-apoptótica é sabido, por exemplo, que o rácio Bax/Bcl-2, ou seja, rácio entre a concentração da proteína Bax relativamente ao número total de proteínas da família Bcl-2, é de extrema importância na regulação da apoptose, sendo que, em tecidos cancerígenos, são visíveis concentrações reduzidas destas proteínas, em resultado da transformação neoplásica em que se encontram [47]. Na apoptose verifica-se um alteração conformacional das proteínas Bax e Bak, que se inserem, em resultado disso, na membrana externa mitocondrial, levando á libertação do citocromo c e de outras moléculas pro-apoptóticas, sendo este processo controlado por outras proteínas da família das Bcl-2 (revisto em [42]).

1.4 - Abordagem experimental utilizada para compreensão da ação de portoamidas isoladas de *Oscillatoria* sp. sobre diferentes linhagens de células cancerígenas

De forma a avaliar o potencial anticancerígeno de portoamidas sobre linhas celulares cancerígenas de origem humana, inicialmente procedeu-se ao crescimento de *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292) de forma a obtenção de biomassa suficiente para os ensaios. A partir da biomassa purificou-se as portoamidas com uso de cromatografia de coluna em gel de sílica associado a HPLC.

Após isolamento e purificação das portoamidas, de modo a atingir o proposto com este trabalho, um dos primeiros objetivos foi avaliar a citotoxicidade das portoamidas nas linhas celulares, com cálculo do valor de CI50 para as linhas que apresentaram alterações estatisticamente significativas para um gradiente definido de concentrações de portoamidas. Para avaliar a citotoxicidade foi realizado o ensaio do MTT, ensaio que se baseia no uso de um sal, um tetrazólio, que possibilita detetar células vivas, na medida em que é substrato de várias desidrogenases, sendo clivado nas mitocôndrias ativas, gerando um sinal proporcional ao grau de viabilidade das células ([50]). Este ensaio é lido tendo por base propriedades espectrofotométricas, com leituras de absorvância num comprimento de onda entre os 500 nm e 600nm, possibilitando uma leitura rápida e de alta precisão [50]. Este ensaio permite avaliar o número de células existentes, que, com uma correta ação por parte da CPT, será tanto menor, quanto maior for a concentração do composto. Este mesmo processo irá ser realizado de forma análoga para as células quando estas foram expostas às portoamidas.

Para avaliar as alterações morfológicas das células das linhas HT-29 e MG-63, quando expostas a portoamidas, bem como quantificar os núcleos em apoptose, foi utilizada a microscopia de fluorescência, com recurso ao *software* CellProfiler. Para a obtenção de imagens de fluorescência, possíveis de análise, foi necessário a coloração tanto do núcleo como do citoplasma, utilizando fluorocromos diferentes para cada estrutura. O núcleo foi corado recorrendo a Hoechst, um derivado de bis-benzimidaz [51], que confere um tom azul ao núcleo das células. Células em apoptose apresentam um núcleo fragmentado ou mais condensado (tom mais intenso) [52], sendo de fácil observação com este fluorocromo. Paralelamente, utilizou-se o iodeto de propídeo (IP) para a coloração do material genético, sendo a sua entrada bloqueada em membranas de células viáveis. O IP cora tanto o núcleo como outras estruturas que apresentem material genético, permitindo comparar células vivas, células em apoptose e células mortas (revista em [24]). Para coloração do citoplasma utilizou-se o laranja de acridina (LA), composto que só entra em células vivas (revisto em [53]).

Em ordem a comparar as alterações morfológicas das células, incluindo a condensação do núcleo para um conhecido indutor de apoptose, as células foram expostas em paralelo a camptotecina (CPT). A CPT é um composto alcaloide, uma quinolona, com alto teor citotóxico, tendo como seu principal alvo de ação sobre o ADN, concretamente a

topoisomerase-I, inibindo por isso a síntese de ADN, podendo funcionar, dessa forma, como um inibidor da atividade tumoral, atuando sobre uma vasta gama tipos de cancro (revisto em [38]). A CPT, nos ensaios em que foi utilizada, funciona como controle positivo, na medida em que é um indutor da apoptose celular.

A avaliação das alterações do perfil proteico foi feita numa abordagem *non-targeted*, com recurso à proteómica. As proteínas foram separadas recorrendo a electroforese bidimensional, obtendo-se o perfil proteico da linha celular HT-29 após exposição a portoamidas [49]. Posteriormente, a espectrometria de massa permitiu identificar as proteínas, tendo sido utilizada a técnica de MALDI-TOF/TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight*), onde as proteínas são primeiramente ionizadas, numa fonte de iões, percorrendo de seguida um campo magnético, sendo que, cada molécula percorre esse campo de forma diferente, consoante a sua constituição, permitindo dessa forma a sua distinção [54]. As proteínas processadas foram depois identificadas recorrendo a sua comparação com valores presentes em base de dados de proteínas, havendo de seguida a necessidade da sua análise estatística de forma a validar os resultados obtidos [55]. No presente trabalho as proteínas foram identificadas por comparação com os valores referência presentes na base de dados *UniProt* (www.uniprot.org).

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Isolamento e purificação de portoamidas.
- 2) Avaliação da citotoxicidade de portoamidas sobre diferentes linhas celulares.
- 3) Avaliação de alterações morfológicas, após exposição a portoamidas, por microscopia de fluorescência.
- 4) Estudo do mecanismo molecular envolvido na citotoxicidade por portoamidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Crescimento de *Oscillatoria* sp. LEGE 05292 para obtenção de portoamidas

2.1.1 - Crescimento em larga escala de *Oscillatoria* sp. LEGE 05292

A estirpe *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292) foi obtida da coleção de culturas do LEGE, tendo o seu crescimento sido realizado em larga escala, de modo a potenciar a quantidade de biomassa obtida. Desta forma a estirpe *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292) foi crescida em balões de vidro com 4L de meio Z8 [56], num total de 20 balões, a uma temperatura de 25°C, com um ciclo de luz/escuridão de 14/10 horas, com irradiância de fotões de 20-30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, por um período de 1 mês. Ao fim do período de crescimento procedeu-se á recolha da biomassa de OSC existente em cada um dos balões, tendo sido posteriormente liofilizada e guardada a -20°C para sua preservação.

2.1.2 - Isolamento das portoamidas produzidas por *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292)

A extração de portoamidas foi realizada como descrita em [2], utilizando cerca de 5 gramas (peso seco) de biomassa de OSC. A única alteração ao protocolo original prende-se com o gradiente utilizado durante o processo de fracionamento, após obtenção do extrato resultante da extração com diclorometano/metanol (2:1). O fracionamento do extrato foi iniciado a 60% de Acetato de Etilo (EtOAc) / 40% de Hexano, seguido de 80% de EtOAc / 20% de Hexano, até 100% de EtOAc, sendo depois 25% de Metanol (MeOH) / 75% EtOAc e, por fim, 100% de MeOH. A alteração introduzida prende-se com o fato de que as portoamidas eluem apenas nas frações mais polares, concretamente na de 100% de MeOH, por isso os compostos mais apolares podem ser eluídos com menor resolução na primeira fração referida.

2.1.3- Purificação e Análise qualitativa das portoamidas A e B por Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência associado a detetor PDA (HPLC-PDA)

A fração eluída a 100% de MeOH do extrato bruto de OSC. (LEGE 05292) foi purificada e analisada qualitativamente num sistema da Alliance e2695 HPLC acoplado a um detetor de PDA 2998 e um colector de frações automático III da Waters (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Para interpretação dos dados foi utilizado o programa Empower 2 Chromatography Data Software. A coluna cromatográfica utilizada foi uma XB-C18 Aeris PEPTIDE (150 mm x 4,6 mm i.d., 3,6 μm , Phenomex, Torrance, Califórnia, EUA), guardada a 35°C. Os eluentes utilizados foram acetonitrilo e água ultra pura, ambos

acidificados com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) com fluxo de 0,8 mL/min. O intervalo no PDA foi de 210 a 800 nm, sendo o comprimento de onda fixo a 254 nm com uma resolução de 1,2 nm.

Para o método de purificação, o volume de injeção foi de 500 µL, sendo a mistura, numa concentração de 0,1% em metanol, separada por eluição gradiente, aplicando-se um aumento linear de solvente orgânico de 50% para 100% por 35 minutos.

Para o método analítico, o volume de injeção foi de 20 µL, sendo a mistura separada por eluição isocrática com 65% de solvente orgânico acidificado com 0,1% de TFA.

2.1.4 - Monitorização da mistura da portoamida A+B por Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa (LC-MS)

Após purificação por HPLC-PDA a amostra de portoamida A+B foi liofilizada, sendo posteriormente ressuspensa em acetonitrilo para análise por LC-MS. A amostra foi injetada num Cromatógrafo de fase líquida Finnigan Surveyor acoplado com o detetor de Espetrometria de Massa MS LCQ Fleet de *ion trap* equipado com fonte de ionização eletrónica, ambos da Thermo Finnigan (Thermo Scientific, San Jose, Califórnia, EUA). Para a aquisição e processamento dos dados usou-se o *software* Xcalibur versão 2 (Thermo Scientific).

De forma a melhorar a sensibilidade do método o azoto foi utilizado com gás nebulizador (80) e como gás auxiliar (20), ambos de unidades arbitrárias. O potencial aplicado ao capilar foi de 22 kV e a temperatura do capilar metálico foi de 350°C. A voltagem *spray* foi de 5,5 kV e 120V para as lentes tubulares.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Hypersil GOLD (100 × 4,6 mm, 5 µm) da Thermo Scientific. O método de eluição foi gradiente e os solventes utilizados acidificados com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi o seguinte:

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	H ₂ O + 1% Acido Fórmico (%)	Acetonitrilo + 1% Acido Fórmico (%)
0	0.8	80	20
40.00		0	100
45.00		0	100
48.00		80	20
55.00		80	20

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	H ₂ O + 1% Acido Fórmico (%)	Acetonitrilo + 1% Acido Fórmico (%)
55.00		80	20

O volume de injeção foi de 20 µL em loop parcial. As amostras foram injetadas em ambos os modos positivo e negativo, em *Full scan* (200-2000 m/z) para uma energia de colisão (EC) de 35.

2.2 - Culturas celulares e manutenção

2.2.1 - Culturas celulares e meios de crescimento

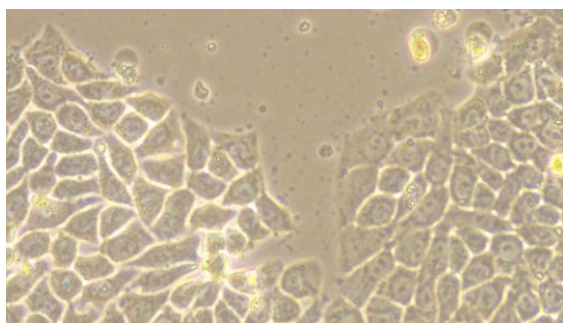


Figura 6- Imagem obtida por microscopia óptica da linha HT-29 (×400).

As linhas celulares de adenocarcinoma colo-rectal (HT-29), neuroblastoma (SH-SY5Y) e carcinoma ductal (T-47D) foram adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). As linhas de carcinoma pulmonar

(A549), osteossarcoma (MG-63), carcinoma do colon (RKO) e carcinoma hepatocelular

(HepG2) foram obtidas de *American Culture Collection* (ATCC) (Manassas, Virginia, EUA). Todas as linhas são de origem humana e foram mantidas em azoto líquido, aliquotadas, de forma a garantir a sua preservação.

Tabela 1 - Indicação da linha celular com descrição do respetivo tipo de cancro.

Linha celular	Tipo de cancro
HT-29	Adenocarcinoma colo-rectal
SH-SY5Y	Neuroblastoma
T-47D	Carcinoma ductal
A549	Carcinoma pulmonar
MG-63	Osteossarcoma
RKO	Carcinoma do colon
HepG2	Carcinoma Hepatocelular

Cada uma das linhas, após descongelamento, e com excepção de SH-SY5Y, foi crescida em meio *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de glutamina, 1% de penicilina/streptomicina, a 100 IU/mL e 10 mg/mL, respetivamente, e 0,1% de fungicida (Life Technologies). A glutamina só foi adicionada nos casos em que o meio já não se encontrava suplementado com a mesma.

A linha SH-SY5Y foi crescida num meio que é uma mistura do meio *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) com o meio *F12 Nutrient Mixture* (HAM's), ambos da Life Technologies, numa proporção de 1:1. Esta mistura foi igualmente suplementada com o meio DMEM, ou seja, com 1% de glutamina, 1% de penicilina/streptomicina, a 100IU/mL e 10 mg/mL, respetivamente, 0,1% de fungicida, para além de 1% de aminoácidos não essenciais (Life Technologies).

2.2.2 - Manutenção das culturas celulares

As células foram cultivadas de forma rotineira, mantidas em 37°C, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) na incubadora 8000 DH (Thermo Scientific), realizando a passagem das células quando estas se encontravam confluentes a 80-100%. Todas as linhas em estudo, exceto SH-SY5Y, são aderentes, ou seja, crescem apenas na superfície do suporte de cultura, enquanto as células da linha SH-SY5Y tanto crescem aderentes como suspensas no meio de cultura.

Para passagem das linhas celulares, primeiramente removeu-se o meio de cultura, exceto no caso da linha SH-SY5Y, onde o meio é guardado de forma a recolher as células que não são aderentes. As células foram então lavadas com Tampão fosfato-salino (PBS, NaCl 8g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,4), de forma a remover restos de meio presentes. De seguida adicionou-se Tripsina (Life Technologies), 1 mL para frascos de cultura de 25 cm³ ou 2 mL para frascos de cultura de 75 cm³, de forma a ressuspender as células aderentes à superfície.

Após um período de 10-15 minutos de incubação, adicionou-se 4 mL de meio completo de forma a parar a ação da tripsina, sendo todo volume presente no frasco de cultura centrifugado em Sigma 2-16PK (Sigma Aldrich), a 1200 rpm por 5 minutos á temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em meio de cultura completo DMEM (Life Technologies). No caso da linha SH-SY5Y as

células não aderentes foram centrifugadas em Sigma 2-16PK, também a 1200 *rpm* por 5 minutos, sendo depois adicionadas as células anteriormente aderentes, sendo ressuspensas em meio de cultura completo EMEM/HAM (1:1). De seguida as células foram transferidas para novo meio de cultura completo, numa diluição de 1:100 relativamente ao número de células inicial.

2.3 – Ensaios de viabilidade celular por MTT

2.3.1- Ensaio de MTT nas diferentes linhas celulares quando expostas a portoamidas e DMSO

O ensaio de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Life Technologies) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações de portoamidas bem como de Dimetilsufóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, Alemanha), sobre as linhas celulares em estudo.

As diferentes linhas celulares, HT-29, A549, MG-63, T-47D, SH-SY5Y, RKO, HepG2, foram plaqueadas, em triplicados, a uma concentração de $3,3 \times 10^4$ células/ml, por um período de 24 horas em meio de crescimento suplementado em placas de 96 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica). Ao fim das 24 horas incubou-se as células, já aderentes, com portoamidas ou DMSO, consoante o ensaio realizado.

No caso de portoamidas (solução stock a 2 mg/mL em 100% de DMSO) realizou-se uma série de 9 diluições do composto, a partir de uma concentração inicial de 10 µg/mL. Inicialmente as diluições foram de 1:3 em 100% de DMSO, sendo que por poço a concentração do DMSO foi de 0,5%. Como controlos utilizou-se tanto meio de cultura completo, bem como meio de cultura completo com DMSO a 0,5%.

Para o DMSO foram usadas 8 concentrações, desde 20% até 0,16%, em diluições de 1:2, sendo o DMSO diluído em meio de cultura completo. Como controlo as células foram incubadas com meio de cultura completo.

As células foram mantidas em exposição às portoamidas ou DMSO por um período de 24 e 48 horas, ao fim das quais se aplicou MTT, numa concentração de 0,5 mg/mL por poço. Ao fim de um período de incubação de 4 horas a 37°C, o meio foi removido, e substituído por DMSO a 100%, num volume de 100 µL por poço, colocando-se em agitação por um

período de 10-15 minutos. A absorvância foi obtida num espectrofotómetro (Biotek Synergy HT, Winooski, Vermont, EUA), com um comprimento de onda de 550 nm.

2.3.2 - Avaliação da morfologia celular na apoptose por microscopia de fluorescência

No processo de avaliação da alteração da morfologia celular no processo apoptótico por fluorescência foram realizados, primeiramente, ensaios com a camptotencina (CPT) (Focus Biomolecules, Plymouth Meeting, Pensilvânia, EUA) e posteriormente com portoamidas.

Numa primeira fase, de forma a elaborar um protocolo de coloração eficiente das linhas celulares, foi utilizado um composto de referência, a CPT, composto que induz a apoptose celular, de forma a induzir a apoptose tal como as portoamidas, apesar de um mecanismo diferente subjacente. Os ensaios com camptotencina foram realizados na linha A549, para com as portoamidas utilizou-se a linha HT-29. Em ambos os ensaios as células foram cultivadas em placas de 24 poços (Orange Scientific), em meio DMEM (Life Technologies) suplementado (500 µL por poço), adaptadas com uma lamela em cada poço, numa concentração de 6×10^4 células/mL, em triplicados. A lamela permitirá que as células cresçam na parte superior da mesma, possibilitando a sua posterior observação ao microscópio, após coloração.

Após um período de 24 horas foi aplicado o composto a testar, CPT ou portoamidas. No caso de CPT usou-se as concentrações de 5 µM e 10 µM, partindo-se de uma solução stock a 10 mM que foi diluída em DMSO 100%. Para as portoamidas as concentrações usadas foram de 10 µg/mL, em ambas as linhas, e 1,25 µg/mL para a linha MG-63 e 1,10 µg/mL para a linha HT-29. Como grupo controlo, em ambos os ensaios, usou-se DMSO numa concentração de 0,5%.

Após 48 horas de incubação das células com CPT ou portoamidas, o meio foi removido de cada poço e lavou-se cada poço com 500 µL de PBS. Após remoção do PBS aplicou-se 200 µL de uma solução com 100 µL de Hoechst 33342 “*trihydrochloride trihydrate*” (HO-33342, a 5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), 100 µL de Iodeto de Propídio (IP, 5 µg/mL) (Fluka, St. Gallen, Suíça), 80 µL de Laranja de Acridina (LA, 4 µg/mL) (Sigma-Aldrich) e 1720 µL de PBS, num volume total de 2 mL. Colocou-se por 10 minutos a 37°C evitando a exposição á luz, efetuando-se posteriormente duas lavagens com PBS. Após remoção do PBS adicionou-se 200 µL de p-formaldeído (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA) a 4% em PBS, pH 7,4, tendo incubado por 10 minutos á temperatura ambiente.

Ao fim dos 10 minutos removeu-se o formaldeído e efetuou-se mais duas lavagens com PBS. A última etapa foi a montagem das lamelas nas lâminas, utilizando-se uma gota de meio de montagem (FluoroMount, Sigma-Aldrich), procedendo-se á observação num microscópio de fluorescência Olympus BX41 (Olympus America Inc., Melville, New York, EUA) com excitação no espectro de luz visível, bem como em outros 3 canais: 1) ultravioleta, 330-385 nm; 2) azul, 460-490 nm; 3) verde, 510-550 nm.

A análise das imagens de fluorescência foi realizada recorrendo ao *software* CellProfiler 2.1.0 (<http://www.cellprofiler.org>). Com este recurso foi possível avaliar área e perímetro celular, bem como caracterizar os núcleos ao nível da sua intensidade e limites. Foi utilizado ainda o programa **Image J** para sobreposição das imagens obtidas de cada um dos canais de fluorescência, anteriormente referidos

2.3.3 - Análise estatística dos resultados dos ensaios de MTT bem como dos dados obtidos pelo *CellProfiler*

Para a análise estatística recorreram-se a dois programas: *GraphPad* 5.0.1 e *SPSS* 22.0 (*Statistical Package for Social Sciences*). O uso do *GraphPad* permitiu, tendo por base os resultados obtidos nos ensaios de MTT para cada uma das linhas celulares, calcular o valor de CI50 (50% da concentração inibitória), após exposição a portoamidas. O cálculo de CI50 foi possível através da criação de curvas dose-resposta da ação das portoamidas sobre as células em estudo. Utilizou-se como valor de 0% de viabilidade a concentração mais alta de portoamidas (10 µg/mL) e como 100% de viabilidade o controlo solvente (0,5% de DMSO).

O *SPSS* 22.0 foi utilizado, tanto para avaliar a significância estatística dos valores obtidos nos ensaios de MTT com DMSO e portoamidas, bem como, na interpretação dos dados obtidos pelo *CellProfiler*, ou seja, variações de área, perímetro e núcleos celulares. Foi utilizado a análise do tipo ANOVA, seguida de um teste de comparação múltipla, teste de Dunnet, sendo utilizado para o teste ANOVA um valor de $p \leq 0,05$.

2.4 - Ensaio de exposição de HT-29 a portoamidas

Células da linha HT-29 foram semeadas em placas de 6 poços, numa concentração de 5×10^5 células/mL, tendo sido mantidas em meio DMEM (Life Technologies) suplementado por um período de 24 horas. Ao fim do período referido, o meio foi removido tendo sido

substituído por meio DMEM suplementado com: 1) DMSO a 0,5% (grupo controlo); 2) Portoamidas nas concentrações 0,5 µg/mL e 1 µg/mL (Tratamentos 1 e 2). Para cada um dos grupos foram realizadas 6 réplicas, tendo-se mantido as células em exposição por um período de 48 horas a 37°C.

2.5- Extração proteica da linha celular HT-29 após exposição a portoamidas

Após o período de crescimento das células da linha HT-29, o meio foi removido e efetuaram-se duas lavagens com PBS, tendo sido, de seguida, adicionados 600 µL de tripsina, por poço. As células foram de seguida transferidas para *tubos* de 2mL, previamente tarados, de forma a serem centrifugadas por 5 minutos a 3000 ×g. Após o fim da centrifugação o sobrenadante foi removido, adicionando-se tampão de solubilização (Ureia (7M), Tioureia (2M), CHAPS (4%), Ditiotretol (DTT) (65mM) e anfólitos (0,8% v/v) todos da Sigma-AI em água destilada) numa proporção de 80 µL de tampão por 15 mg de biomassa celular. Após esta etapa tudo se realizou no gelo, de forma a evitar a precipitação de substâncias indesejáveis no processo, como hidratos de carbono ou ADN.

Após a adição do tampão, cada *tubo* foi sujeito a dois períodos de *vortex* por 20 segundos, sendo colocados de seguida no gelo por 30-45 minutos (entre cada um dos períodos de *vortex* os *tubos* devem ser colocados no gelo para evitar sobreaquecimento). Após o período no gelo realizou-se uma centrifugação a 16000 ×g por 20 minutos a 4°C. Com o sobrenadante obtido foi realizado a quantificação proteica segundo o método de Bradford (1976), segundo o protocolo fornecido com *Bio-Rad Bradford Protein Assay (Bio-rad)*.

Após a quantificação, o sobrenadante remanescente foi transferido para tubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C até ser utilizado.

2.6 – Abordagem proteómica para avaliação das alterações proteicas de HT-29 após exposição a portoamidas

2.6.1 - Electroforese bidimensional das células da linha HT-29 após exposição a portoamidas

A electroforese bidimensional realizou-se com base nos protocolos utilizados no laboratório LEGE (baseado em [57,58]). A partir dos valores obtidos na quantificação proteica, para cada um dos extratos proteicos, anteriormente congelados, retirou-se um volume correspondente a 300 µg de proteína e adicionou-se solução de solubilização, acrescida de bromofenol, num volume total de 400 µL.

De seguida procedeu-se à etapa da focagem isoelectrica, aplicando-se cada amostra no suporte de focagem isoelectrica, com colocação da tira de electroforese com gradiente de pH 3-10 (Biorad, EUA, Califórnia) ficando a parte do gel de acrilamida em contacto com a amostra, aplicando-se 3 mL de óleo mineral por cima da tira. O suporte foi então transferido para o voltímetro (*Bio-rad Protean IEF Cell*) onde inicialmente realizou-se uma reidratação do gel por 12 horas a 50V, seguido de um programa de focagem das proteínas no gel, consistindo na seguinte sequência de voltagens: 250V por 15 minutos, 10000V por 3 horas, 10000V/h até aos 60000V, sendo o sistema mantido, posteriormente, a 500V, até remoção das tiras de eletroforese do suporte, para evitar a difusão das proteínas.

Após o término da focagem isoelectrica e antes da segunda dimensão da electroforese bidimensional é necessário proceder a uma fase de equilibração das tiras de eletroforese. Para esse fim, preparou-se, inicialmente, uma solução aquosa com Tris-HCl (50 mM, pH 8,8), Ureia (6M) (Sigma-Aldrich, EUA, Missouri), Glicerol (30%) (Sigma-Aldrich, EUA, Missouri), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (2%) e alguns grãos de bromofenol (Sigma-Aldrich, EUA, Missouri). Com base nesta solução prepararam-se outras duas distintas: solução I, a solução anteriormente referida mais DTT (Sigma-Aldrich, EUA, Missouri), 100 mg de DTT para 10 mL de solução; solução II, solução aquosa mais iodoacetamida (Biorad, EUA, Califórnia), com 250 mg de iodoacetamida por 10 mL de solução. Para cada tira foram utilizados 2,5 mL de cada uma das soluções, tendo sido aplicada primeiro a solução I e depois a II, por períodos de 15 minutos em agitação.

A segunda dimensão consistiu na electroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A electroforese foi realizada no sistema de fonte de energia Hoefer PS600 acoplada unidade de vertical de electroforese Hoefer SE900 (Hoefer, EUA, Massachusetts). O sistema de electroforese possibilita a corrida de 6 géis de poliacrilamida ao mesmo tempo, para sua polimerização é necessário um volume de 400 mL de gel, constituídos por: 166,7 mL de acrilamida a 37% (Biorad, EUA, Califórnia), 124,8mL de água destilada, 100 mL de tampão Tris-HCL (pH 8,8), 4,0 mL de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) (Sigma-Aldrich) a 10%, 4,0 mL de APS (*Ammonium persulfate*) (Sigma-Aldrich) a 10% e 550 µL de TEMED (*N,N,N',N'*- tetramethylethylenediamine) (Bio-rad) a 10%.

Após equilibração das tiras de focagem isoelectrica estas foram aplicadas nos géis juntamente com os marcadores de peso molecular (Bio-rad) tendo-se iniciado então a 2ª dimensão, com uma amperagem de 480mA constantes por um período de cerca de 6 horas.

2.6.2 - Fixação e Coloração dos géis de poliacrilamida dos extractos proteicos das células da linha HT-29

Após o término da corrida de eletroforese cada um dos géis de poliacrilamida foi removido dos seus suportes e transferido para uma solução aquosa de metanol (40% v/v) (Merck, EUA, Nova Jérсия) e ácido acético (10% v/v) (Panreac, Espanha, Barcelona), usando-se 200 mL por gel, tendo sido mantidos por 24 horas nesta solução.

Após a fixação segue-se a coloração dos géis segundo o protocolo descrito em [59], em que a solução de coloração é constituída por uma solução A a 98% e uma solução B a 2%. A solução A tem ácido orto-fosfórico (2% p/v) (Merck) e sulfato de amónio (10% p/v) (Fischer Scientific, EUA, Massachusetts), enquanto a solução B contem Azul de Coomassie (5% p/v) (Sigma-Aldrich). Para a coloração misturaram-se 4 volumes da solução de coloração com 1 volume de metanol (Sigma-Aldrich), usando 200 mL desta mistura por gel. Antes da aplicação da mistura de coloração cada gel foi lavado duas vezes com 100 mL de água desionizada. Cada gel foi então mantido em agitação, na mistura de coloração, por 24 horas.

Ao fim deste período, removeu-se a solução de coloração, e cada gel foi lavado duas vezes com 100 mL de água desionizada, sendo armazenado numa solução aquosa de sulfato de amónio (20% p/v), usando-se 200 mL por gel.

2.6.3 - Análise proteómica dos géis de poliacrilamida dos extratos proteicos das células da linha HT-29

A análise proteómica dos géis obtidos consistiu, primeiramente, na obtenção da imagem digital dos géis utilizando o *software Quantity One* (Bio-rad), associado ao densitómetro GS-800 da Bio-rad. A análise proteómica das imagens obtidas foi subsequentemente realizada através do *software PDQuest* (Bio-rad), e consistiu nas seguintes fase: 1- deteção dos *spots* nos géis; 2- alinhamento dos géis; 3- determinação da intensidade relativa de cada *spot*. O teste t-student ($P \leq 0,05$) foi utilizado para observar variações na intensidade (abundância relativa) de cada *spot*, nas diferentes condições experimentais. Este processo de análise foi feito para cada gel do grupo controlo e tratamentos, sendo tendo sido analisados 6 géis por grupo, num total de 18.

2.6.4 - Preparação das proteínas extraída de HT-29 expostas a portoamidas para a realização de Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI)

Após a seleção dos *spots* com interesse biológico com recurso ao *software PDQuest*, estes foram excisados dos géis tendo sido lavados com 30 μL de água ultra pura por 20 minutos, à temperatura ambiente. Ao fim deste período removeu-se a água, adicionando o mesmo volume de acetonitrilo (ACN) (50%), incubando por 45 minutos a temperatura ambiente em agitação, para remoção de toda a coloração dos pedaços de gel. Após total descoloração dos pedaços de gel removeu-se o ACN e adicionou-se 30 μL de ACN a 100%, por 5 minutos, ao fim dos quais se substituiu por novo ACN a 100%, mantendo-se à temperatura ambiente e em agitação por 30 minutos. Após esta fase o solvente foi removido e os pedaços de gel desidratados por 12 horas à temperatura ambiente. Após estarem totalmente secos, adicionou-se 20 μL de tripsina (Promega, Madison, Wiscosin, EUA) numa concentração de 6,7 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, por 30 minutos em gelo.

Nota: Para a preparação prévia da tripsina (Promega), esta foi diluída em ácido acético (Panreac) a 0,001%, numa concentração final de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta solução foi posteriormente diluída em hidrogenocarbonato de amónio ($\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{H}$) a 50 mM para obtenção da concentração final de 6,7 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ de tripsina.

Após os 30 minutos no gelo, o excesso de tripsina é removido e adiciona-se 20 µL de $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{H}$ (50 mM) e deixou-se a incubar por 15 horas a 37°C, guardando-se posteriormente os sobrenadantes a -20 °C até aplicação na placa de MALDI.

Para aplicação na placa de MALDI-TOF (123x81 mm) (Life Technologies), as amostras foram previamente dessalinizadas e concentradas usando micro colunas C18 (Thermo Scientific) de 10 µL, sendo necessário uma micro coluna por amostra. Primeiramente, as colunas foram ativadas com ACN a 50%, com 2 ciclos de 10 µL, sendo de seguida equilibradas com ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich), novamente 2 ciclos de 10 µL. Após a preparação das colunas, e de forma a promover a ligação dos péptidos à coluna, cada amostra foi aspirada e dispensada 10 vezes, sendo a coluna lavada de seguida com 0,1% de TFA em 5% de ACN em água destilada, por 2 ciclos de 10 µL. Os péptidos foram então eluídos com a matriz de MALDI (50% de ACN, 2% de TFA a 5%, 7-8 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e 48% de água destilada) e aplicados na placa de MALDI com 0,5 µL por amostra e em duplicados.

2.6.5 - Identificação das proteínas por MALDI-TOF

A identificação por espectrometria de massa foi realizada através de MALDI-TOF/TOF, tendo sido realizada na Universidade de Aveiro, no departamento de Química. Após o processamento das proteínas, recorrendo à técnica de MALDI-TOF/TOF, a sua identificação foi realizada por comparação com sequências de proteínas presentes na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>), tendo sido admitidas as proteínas com um intervalo de confiança para o valor de *protein score* superior a 95% e com presença em ambas as réplicas, para cada amostra processada. Foi também utilizado o software STRING (<http://string-db.org>) para avaliar interações entre proteínas e o software PANTHER (www.pantherdb.org) para identificar mecanismos celulares em que estas se encontrem envolvidas.

RESULTADOS

3-RESULTADOS

3.1 – Purificação e isolamento de portoamidas a partir de *Oscillatoria* sp. (LEGE 05292)

Em 8 meses de crescimento de *Oscillatoria* sp. LEGE 05292 obtiveram-se 5,35 g de biomassa liofilizada, a partir da qual se efetuou a extração de portoamidas.

3.1.1 - Purificação e Análise qualitativa de Portoamida A e B por HPLC-PDA

Consoante descrito na metodologia, a fração eluída com MeOH a 100% a partir do extrato bruto de OSC. (LEGE 05292) foi purificada por HPLC, de modo a obtenção de um mistura das portoamidas A e B. De seguida são apresentados os espectros obtidos pelo método de purificação, com indicação dos dois picos correspondentes às portoamidas A e B.

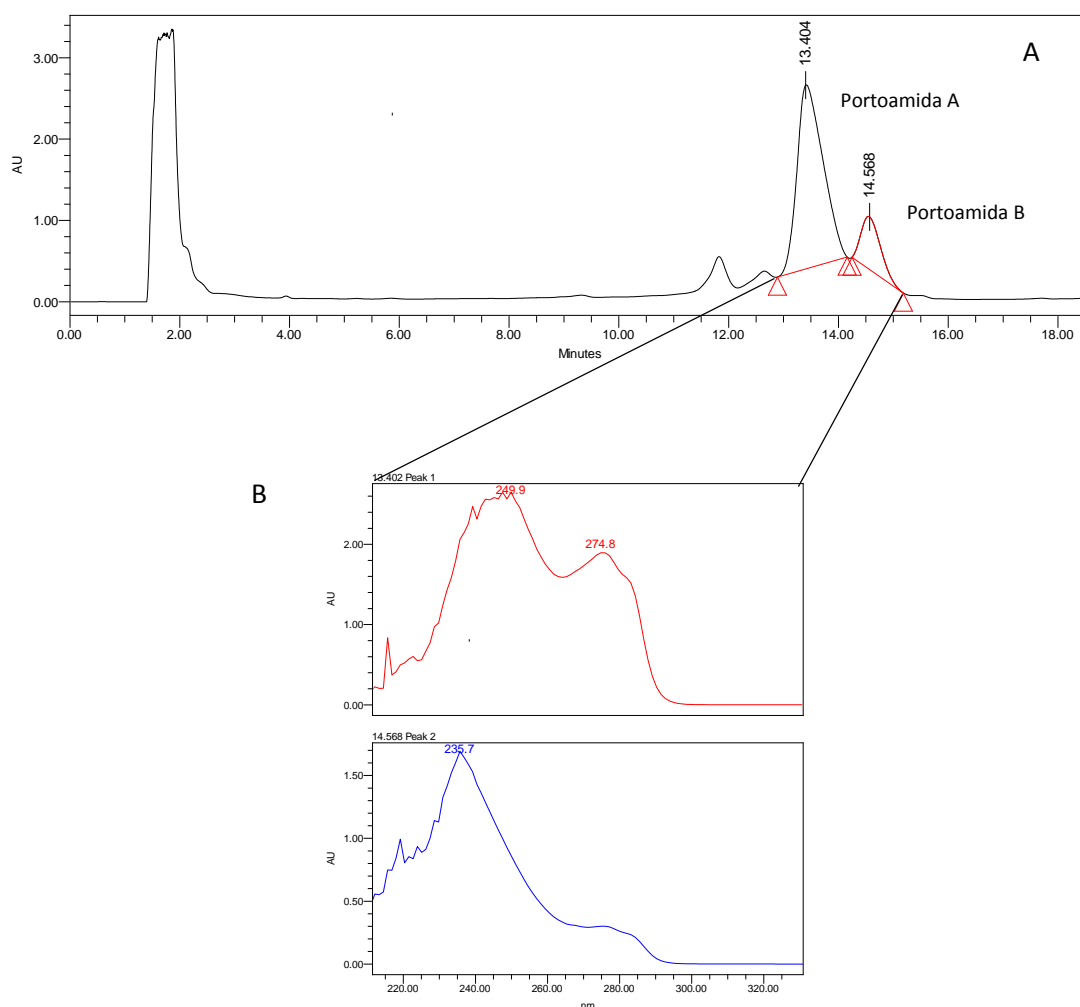


Figura 7 - Espectro de Absorção da fração E (A) resultante da extração realizada a OSC. LEGE 05292, com indicação da variação da absorvância (AU) em função do tempo de corrida (minutos), e PDA (B) para os picos correspondentes a portoamida A (pico 1) e portoamida B (pico 2), com indicação da absorvância em

função do comprimento de onda usado. O espectro de absorção tem evidenciados todos os picos da fração, concretamente os 4 correspondentes as portoamidas identificadas em [2], sendo no espectro do PDA evidenciados os picos correspondentes a portoamida A e portoamida B.

Após o isolamento dos dois picos, como descrito na metodologia, estes foram processados segundo o método analítico, com a obtenção dos seguintes espectros.

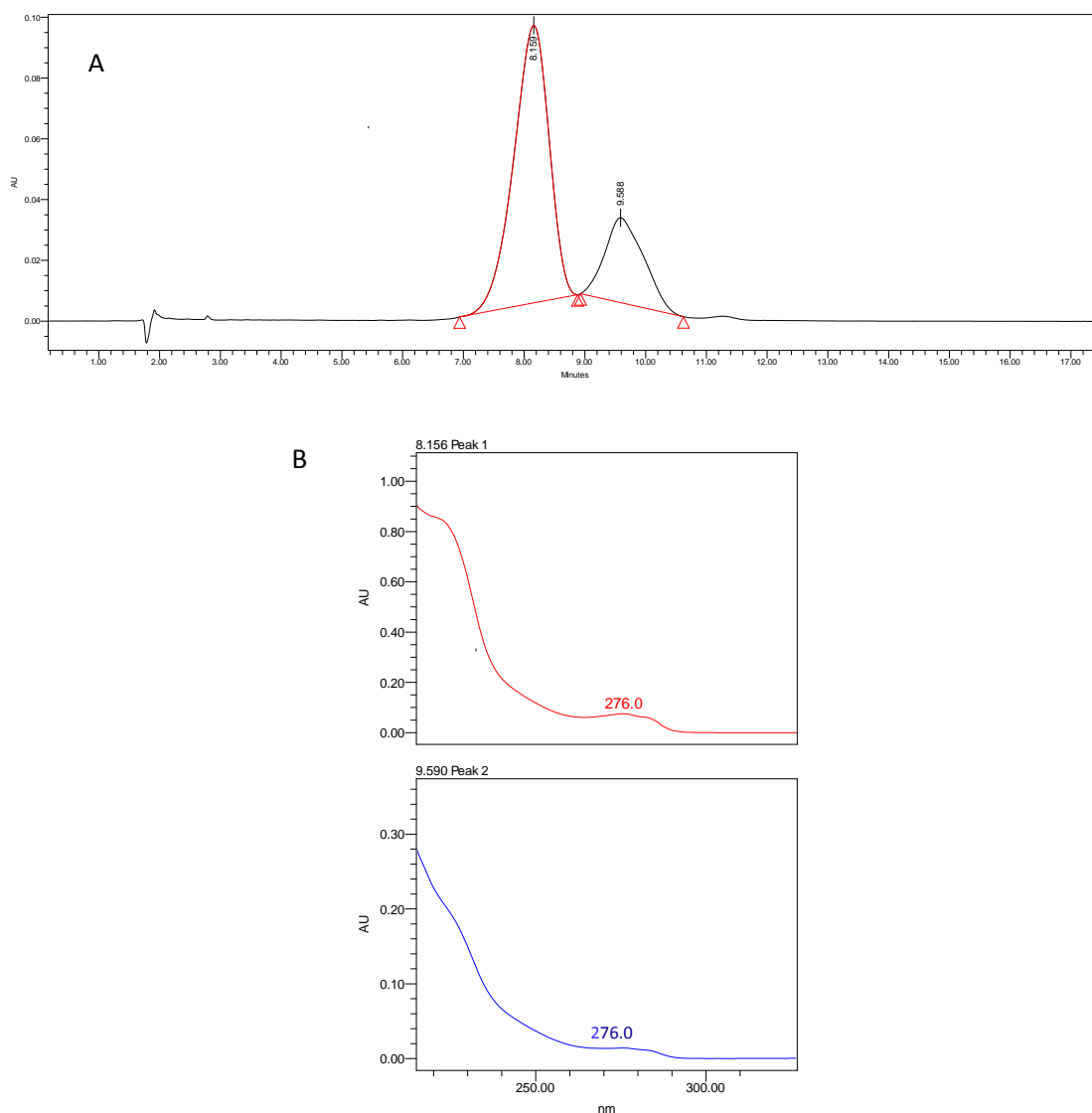


Figura 8 - Espectro de absorção (A), obtido segundo o protocolo do método analítico, com representação da absorvância em função do tempo. O primeiro pico representa a portoamida A, enquanto segundo pico representa a portoamida B. Espectros de PDA, de cada um dos picos do espectro de absorção, tendo uma absorção no comprimento de onda de 276.0 nm.

Pela interpretação dos espectros obtidos foi possível constatar que a área relativa de cada um dos picos das portoamidas A e B, relativamente á área total do espectro, presente na

fração eluída, é de 3:1, respetivamente. Após a recolha de toda a mistura das portoamidas esta foi liofilizada, tendo sido obtidos 30 mg de composto (peso seco).

3.1.2- Monitorização da mistura da portoamida A+B por Cromatografia Líquida-Espetrometria de Massa (LC-MS)

O recurso à técnica de LC-MS possibilitou a monitorização da massa do composto purificado, anteriormente, pela técnica de HPLC-PDA. Tendo por base os dados recolhidos de [2] é sabido que a razão massa/carga (m/z) da portoamida A será de 1532, enquanto o valor para a portoamida B será de 1502. Primeiramente, foi obtido o espectro TIC (Total Ion Chromatogram), a partir do qual foi possível identificar o pico da portoamida A, presente aos 13,34 minutos, e o pico da portoamida B, presente aos 13,56 minutos, como visível na Figura 9.

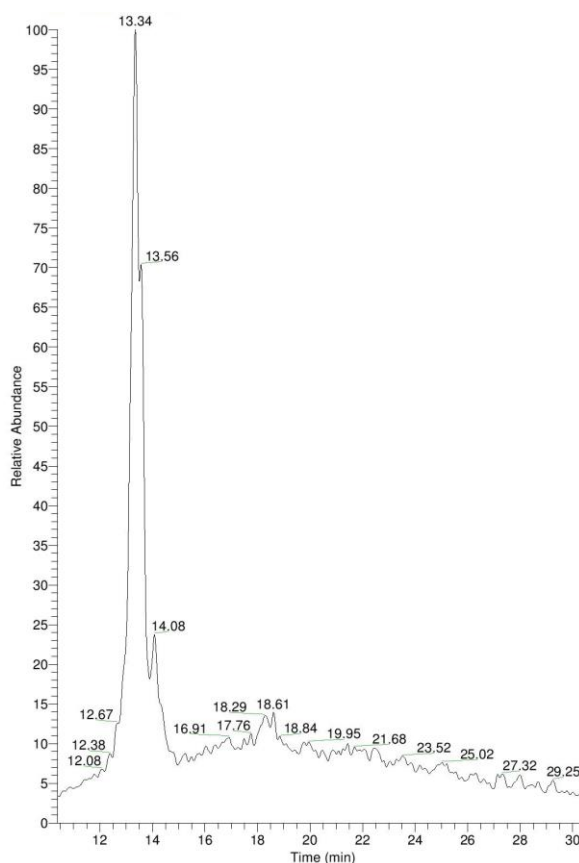


Figura 9 - Cromatograma TIC (Total Ion Chromatogram) em modo positivo, com representação da abundância relativa em função do tempo de corrida (minutos). O Pico a 13,34 minutos representa a portoamida A, enquanto o pico a 13,56 minutos representa a portoamida B.

Com base no espectro TIC realizou-se os espectros XIC (Extracted Ion Chromatogram) de forma a comprovar a presença das duas portoamidas.

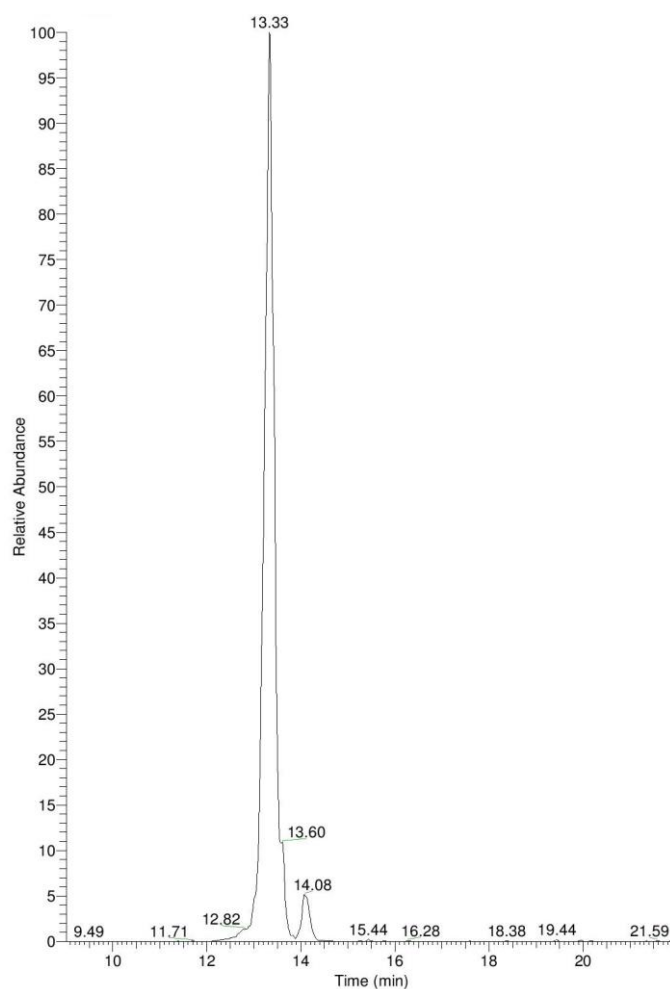


Figura 10 - Cromatograma XIC (Extracted Ion Chromatogram) em modo positivo, com representação da abundância relativa em função do tempo de corrida (minutos). O Pico a 13,33 minutos representa o pico extraído a partir do TIC, numa gama de massas de 1531.5-1532.5 m/z , $[M+H]^+$

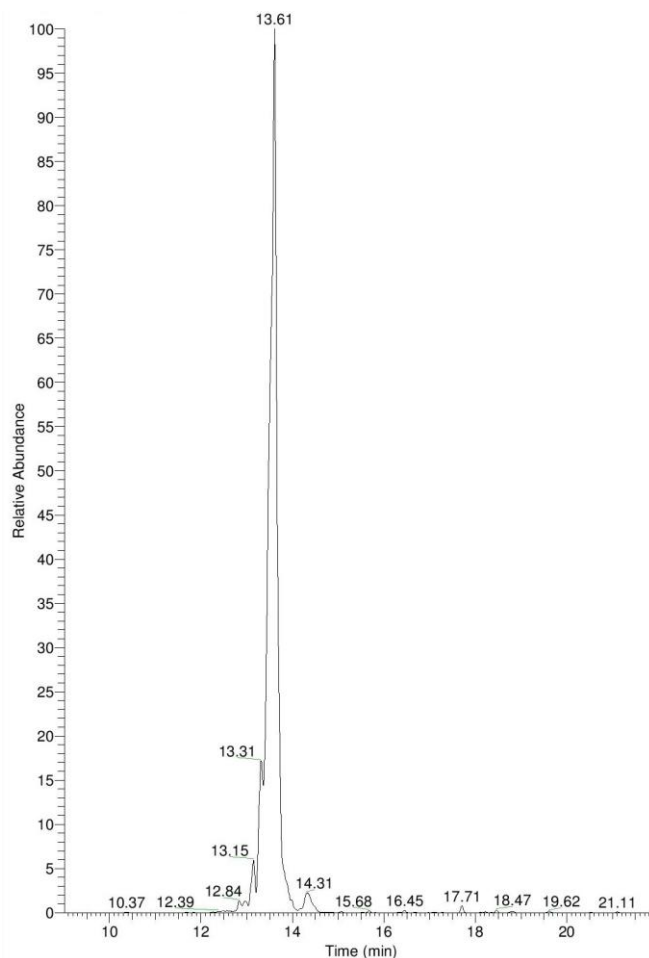


Figura 11 - Cromatograma XIC (Extracted Ion Chromatogram) em modo positivo, com representação da abundância relativa em função do tempo de corrida (minutos). O Pico a 13,61 minutos representa o pico extraído a partir do TIC, numa gama de massas de 1501.5-1502.5 m/z , $[M+H]^+$.

Com base no espectro TIC obtido, obteu-se o espectro de massa ESI em modo positivo, para cada um dos dois picos correspondentes às portoamidas A e B, de forma a comprovar a presença das duas portoamidas na fração que foi recolhida.

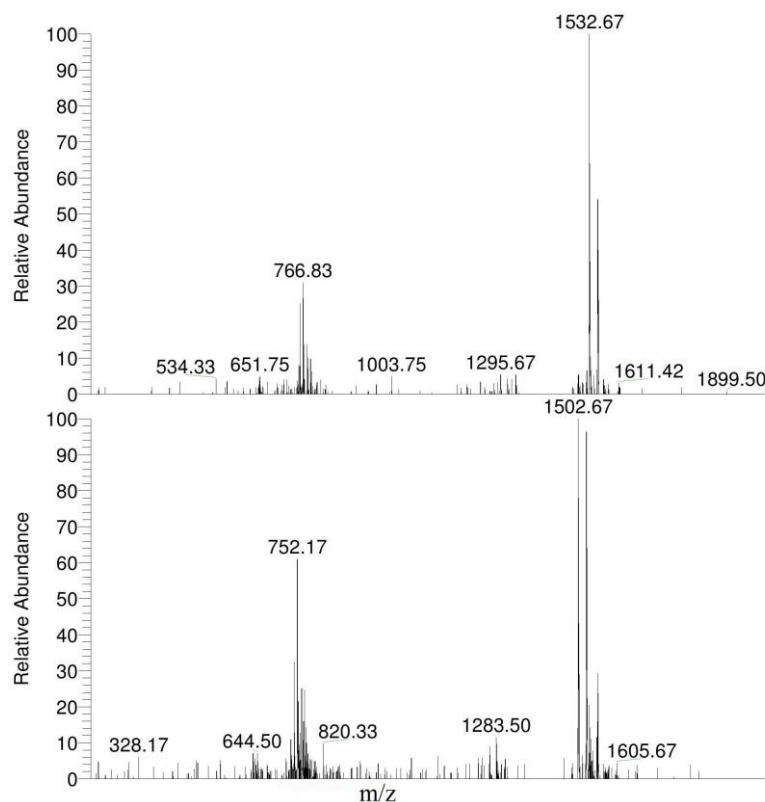


Figura 12 - Espectros de Massa ESI, em modo positivo, com indicação da abundância relativa em função da razão massa/carga (m/z), para a portoamida A (1532 m/z , $[M+H]^+$) e portoamida B (1502 m/z , $[M+H]^+$).

3.2 – Ensaio de MTT para avaliação da citotoxicidade de portoamidas sobre as linhas celulares cancerígenas

3.2.1 - Ensaio de MTT com exposição a DMSO para avaliação da citotoxicidade do composto sobre as linhas celulares MG-63, HT-29, A549 e SH-SY5Y

De forma a avaliar o nível de citotoxicidade do DMSO sobre diferentes linhas celulares em estudo (MG-63, HT-29, A549 e SH-SY5Y), foi realizado o ensaio de MTT com exposição das mesmas ao DMSO. Os gráficos seguintes mostram os resultados do ensaio de MTT para cada linha celular quando sujeitas a um gradiente de concentrações de DMSO, desde 20% até 0,16%, em diluições de 1:2.

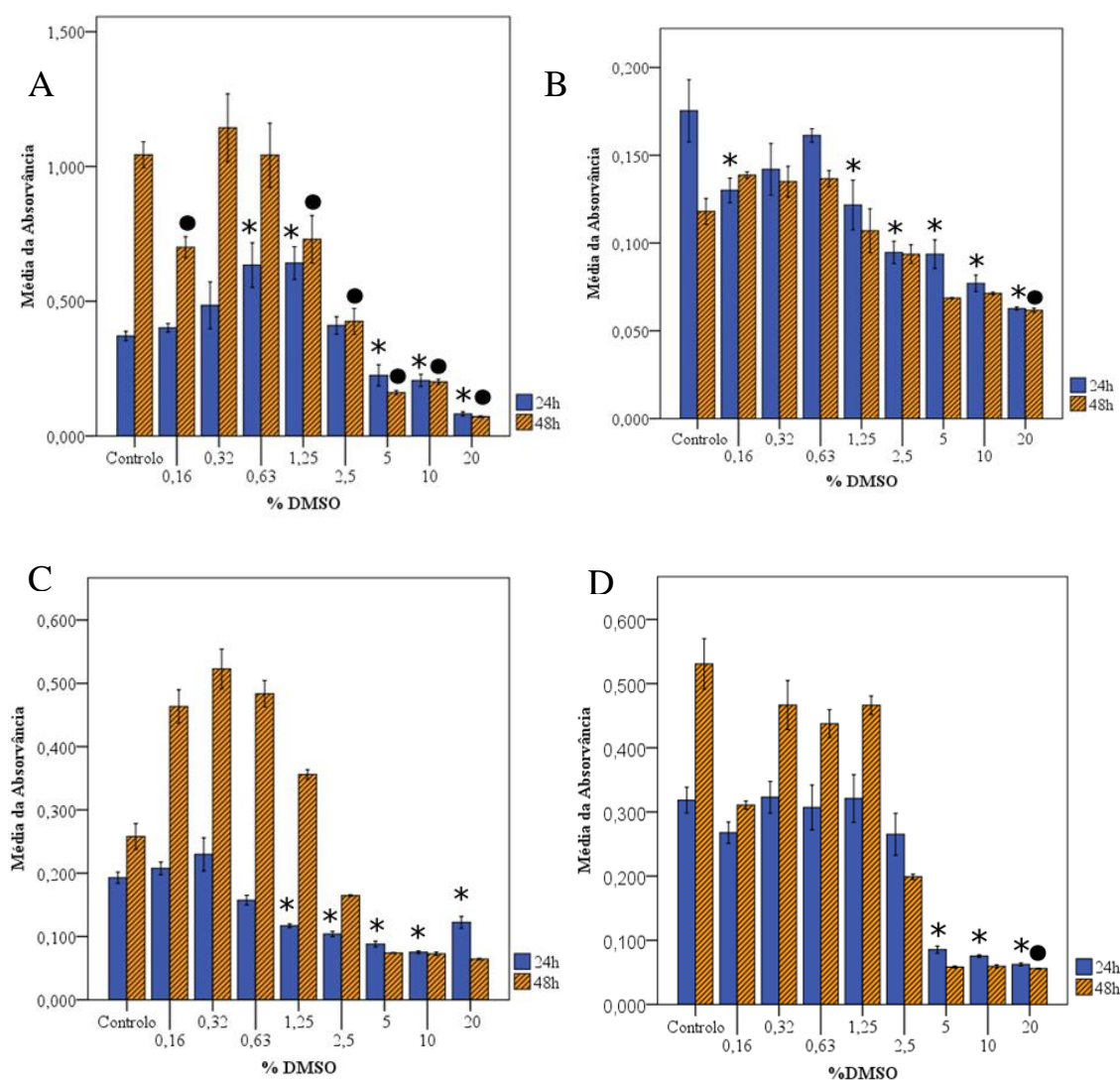


Figura 13 - Representações gráfica da média das absorvâncias em função da percentagem de DMSO testada para as linhas MG-63 (A), HT-29 (B), A549 (C) e SH-SY5Y (D), com indicação dos valores para 24 e 48 horas de ensaio. (*) Indica diferenças significativas para com o controlo solvente para 24 horas, enquanto (●) indica diferenças significativas para 48 horas, com $p \leq 0,05$, para ambos os casos.

3.2.2 - Ensaio de MTT para as linhas celulares A549, T-47D, SH-SY5Y, HepG2, MG-63, RKO e HT-29 após exposição a portoamidas

Numa primeira fase, de forma a avaliar o efeito citotóxico das portoamidas sobre diferentes linhas de células cancerígenas de origem humana, foi realizado o ensaio de MTT. O ensaio foi realizado para 24 e 48 horas após exposição a portoamidas, em cada linha. De seguida apresenta-se os gráficos de valores de absorvância em função das concentrações de portoamidas para a linha A549 (funcionando como representativa de todas as linhas sem

variação de absorvância, dentro da gama de concentrações testadas), RKO, HT-29 e MG-63. Nenhum efeito foi observado na viabilidade celular das linhas celulares A549, HepG2, T-47D e SH-SY5Y, como demonstrado na Figura 14. Para as linhas RKO, HT-29 e MG-63 verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, sendo que, na linha MG-63, a diminuição da viabilidade se verificou para todas as concentrações das portoamidas relativamente ao controlo solvente (Figura 15). Assim, para as linhas HT-29 e RKO, foram construídas curvas-dose resposta de forma a obter o valor de CI50 para as portoamidas sobre estas linhas, utilizando o software *GraphPad*.

A) A549

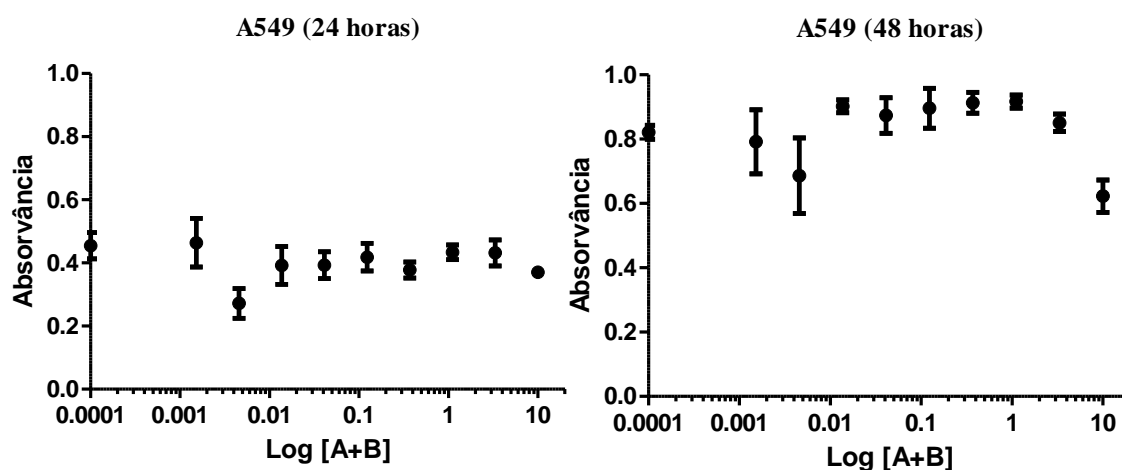


Figura 14 – Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha A549. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha A549, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

Pela análise do gráfico da Figura 14 não é visível uma influência da concentração das portoamidas na viabilidade celular, dentro das concentrações testadas. Este facto revela um baixo efeito citotóxico do composto, tendo por base as concentrações utilizadas no ensaio, sobre a linha A549. O efeito citotóxico foi também semelhante para as linhas HepG2, T-47D e SH-SY5Y.

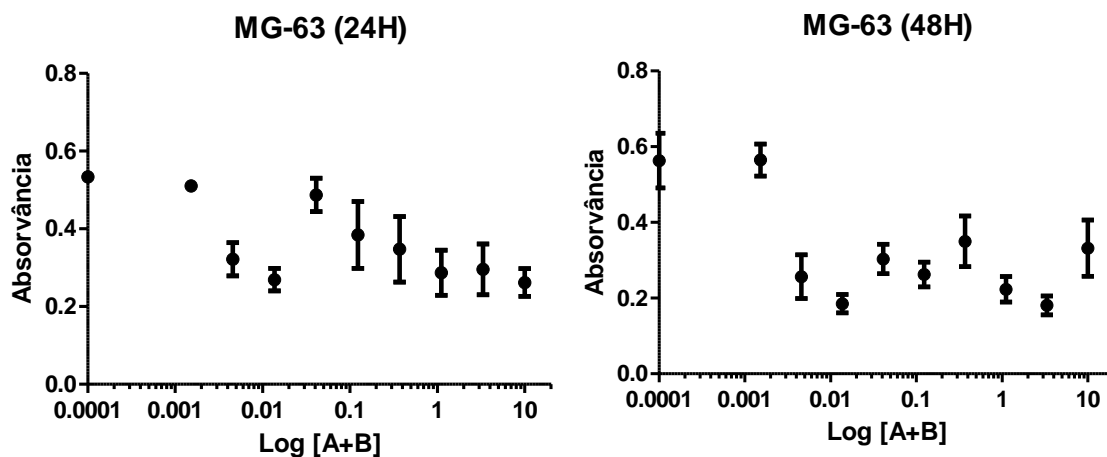
B) MG-63

Figura 15 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular MG-63. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha MG-63, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

Nos gráficos da variação de absorvância para a linha MG-63, é visível uma diminuição da absorvância, relativamente ao controlo, para as diferentes concentrações de portoamidas. Contudo esta variação não apresenta um padrão, não tendo sido possível calcular o valor de CI50. Assim, a percentagem de inibição, para 24 horas de exposição foi cerca de 50%, enquanto para 48 horas de exposição foi cerca de 33%.

C) RKO

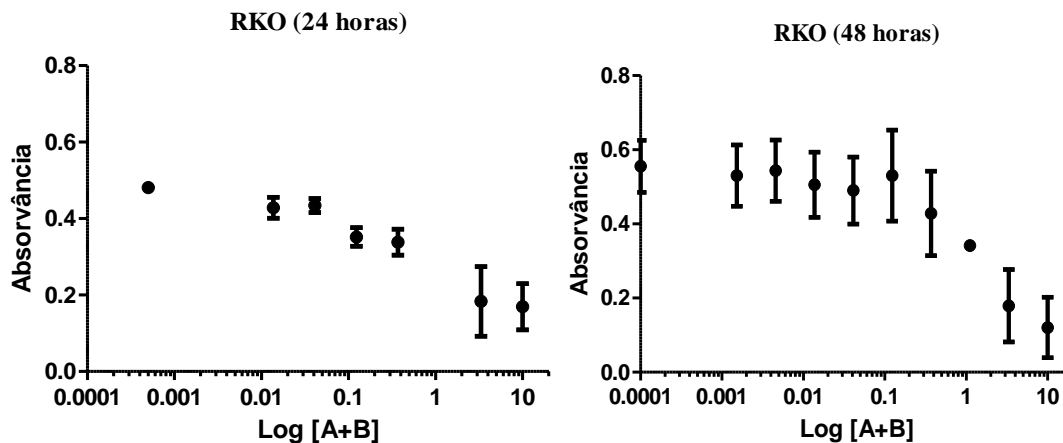


Figura 16- Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular RKO. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha RKO, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

Mediante a observação dos valores da absorvância para a linha RKO, quando exposta a portoamidas, foi visível uma diminuição dos valores de absorvância à medida que se verifica um aumento da concentração de portoamidas. Tendo por base os valores obtidos, foram construídas curvas-dose resposta para a linha RKO, de forma a avaliar o efeito da viabilidade celular após exposição a portoamidas (Figura 17).

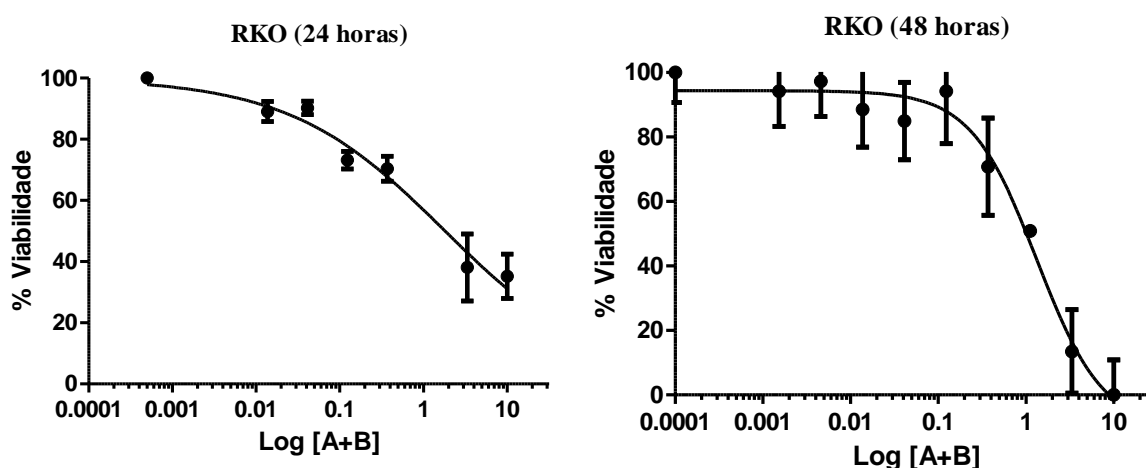


Figura 17 - Gráfico da variação da viabilidade celular (em percentagem) em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular RKO. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha RKO, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

Foram obtidos os valores de CI50 de 1,812 $\mu\text{g/mL}$ e 1,336 $\mu\text{g/mL}$ para 24 e 48 horas, respetivamente. A percentagem real de inibição para estes valores de CI50 foi de 55% e 90% relativamente ao controlo, respetivamente.

D) HT-29

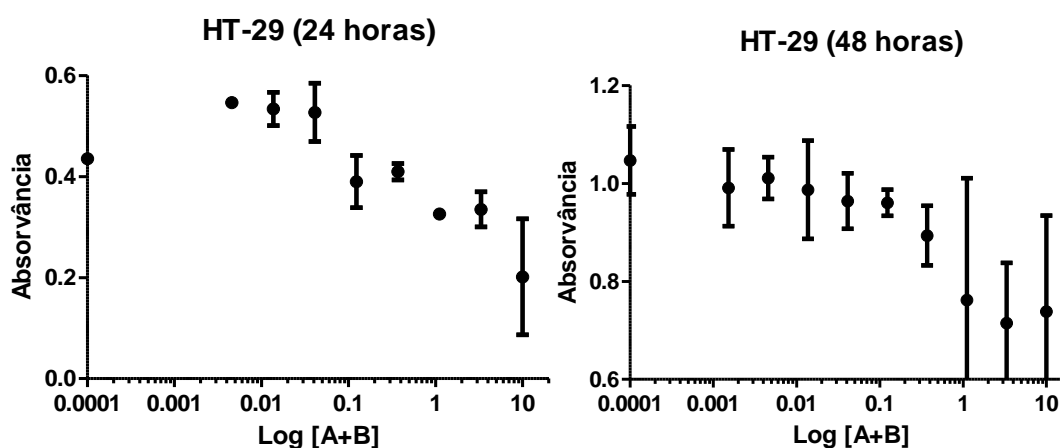


Figura 18 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular HT-29. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha HT-29, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

Como evidenciado nos gráficos acima a linha HT-29, aquando da sua exposição a portoamidas, sofre uma alteração dos valores da absorvância, com uma diminuição acentuada para valores mais altos da concentração do composto. Tal facto levou a criação de curvas de dose-resposta de forma a calcular os valores de CI50 para a linha HT-29 quando exposta a portoamidas (A+B).

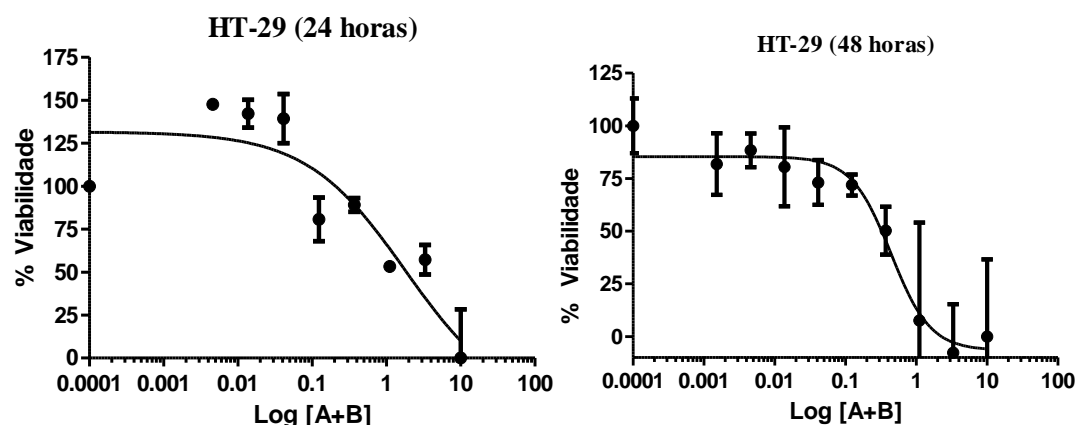


Figura 19 - Gráfico da variação da absorvância em função do logaritmo da concentração das portoamidas (A+B) para a linha celular HT-29. Cada gráfico é representativo do período de exposição indicado no mesmo para a linha HT-29, sendo o controlo identificado pelo ponto a 0,0001 de Log [A+B].

A partir das curvas de dose resposta acima foi possível obter o valor de CI50 de 1,781 $\mu\text{g/mL}$ para 24 horas e de 0,4395 $\mu\text{g/mL}$ para 48 horas. A percentagem real de inibição para estes valores foi de 50% e de 60% relativamente ao controlo, respetivamente.

A Tabela 2 resume o efeito citotóxico das portoamidas sobre as linhas celulares, bem como os valores de CI50 para as linhas RKO e HT-29.

Tabela 2 - Tabela de valores de CI50 ($\mu\text{g/mL}$) para cada linha em estudo, no período de 24 e 48 horas. Linhas com efeito citotóxico reduzido não apresentam valor de CI50, estando sinalizadas com (-). Linhas RKO e HT-29 com respetivos valores de CI50 para 24 e 48 horas.

Linhas	CI50 (24 horas) ($\mu\text{g/mL}$)	CI50 (48 horas) ($\mu\text{g/mL}$)
A549	-	-
MG-63	-	-
HepG2	-	-
SH-SY5Y	-	-
T-47D	-	-
RKO	1,812	1,336
HT-29	1,781	0,4395

3.3 - Análise de alterações morfológicas após exposição da linha A549 a Camptotencina e das linhas MG-63 e HT-29 a portoamidas, recorrendo a microscopia de fluorescência

Foram obtidas imagens por microscopia de fluorescência, da linha A549, após exposição a camptotencina, e das linhas MG-63 e HT-29, após exposição a portoamidas. As imagens seguintes refletem o processo de análise do programa, com identificação dos diferentes componentes celulares, possibilitando a análise estatística num passo seguinte.

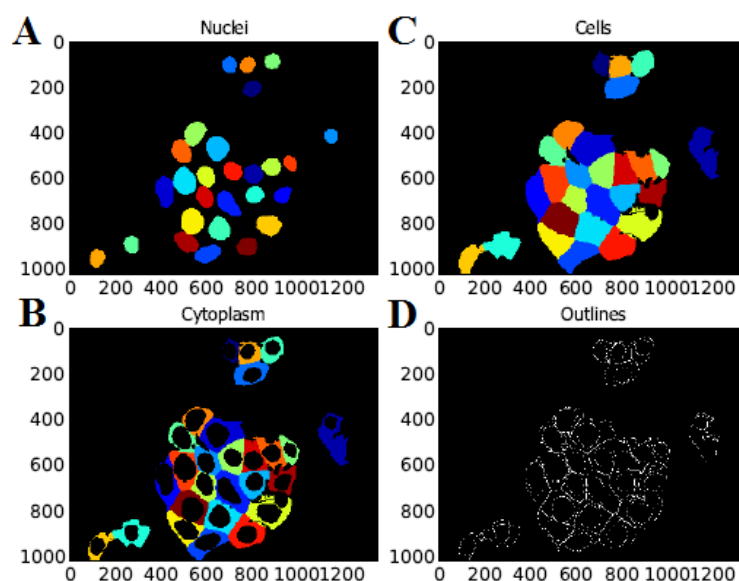


Figura 20 - Reconhecimento do núcleo (A), citoplasma (B), células (C) e contorno celular (D) pelo CellProfiler 2.0.1

Para além da importância na identificação de componentes celulares, um outro aspeto de realce, é a capacidade da distinção de núcleos em apoptose de núcleos normais. Este fato foi possível devido a capacidade do programa CellProfiler de identificar núcleos condensados e distinguir os mesmos pela sua intensidade. Tal fato merece destaque, pois núcleos em apoptose encontram-se mais condensados e com uma intensidade maior.

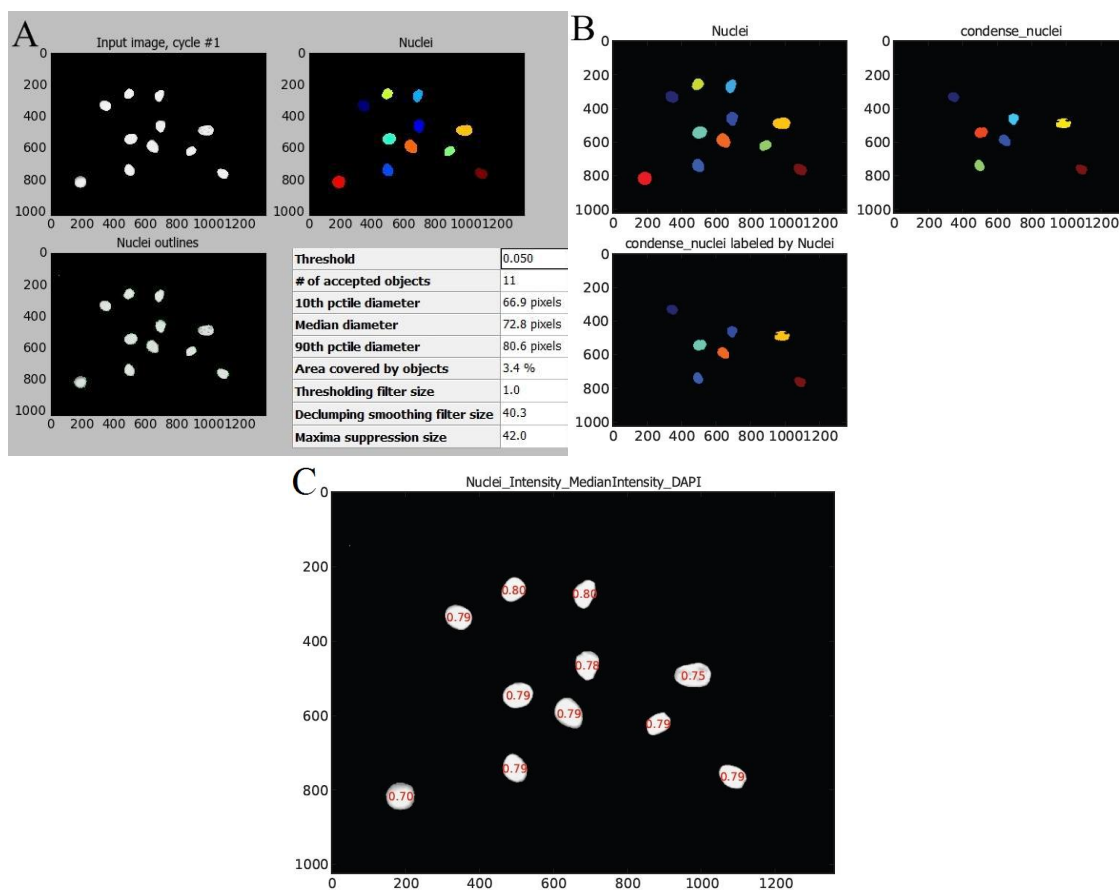


Figura 21 – Reconhecimento do núcleo (A), avaliação dos núcleos condensados (B) e avaliação da intensidade dos núcleos (D) pelo CellProfiler 2.0.1.

Com base nos dados recolhidos no programa *CellProfiler* realizou-se a análise estatística dos valores médios da área e perímetro de determinados parâmetros celulares (núcleo, citoplasma e célula no seu todo), após exposição da linha A549, após exposição a camptotecina, e das linhas MG-63 e HT-29 após exposição a portoamidas. A análise estatística recorreu ao programa SPSS, admitindo-se um valor de $p \leq 0,05$.

3.3.1 – Exposição de A549 a camptotencina

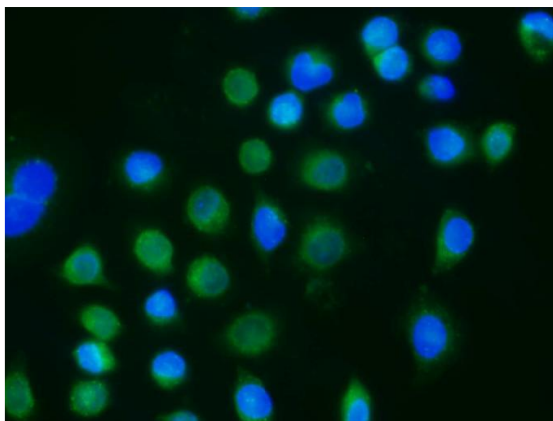


Figura 22 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha A549 após exposição a camptotencina, numa concentração de 10 μM (ampliação $\times 400$). A imagem resulta na sobreposição do canal azul (marcação dos núcleos por HO), canal verde (marcação do citoplasma por Laranja de Acridina). Imagem: Image J.

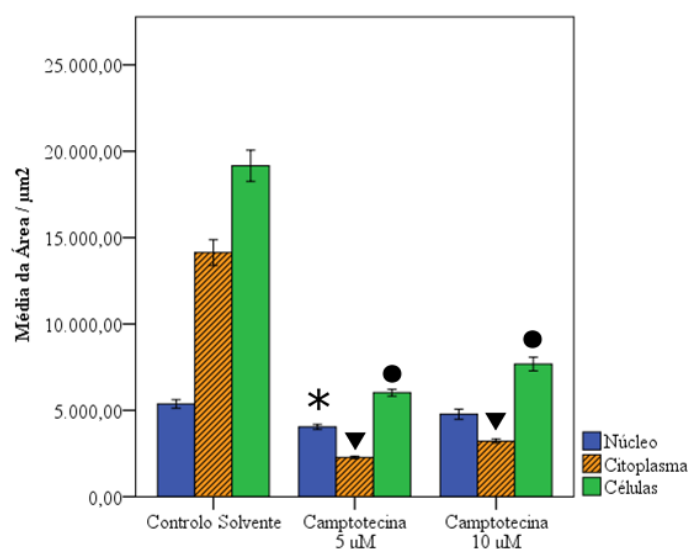


Figura 23 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e tratamentos com camptotencina, nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, referente à linha A549. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 62 núcleos, para camptotencina a 5 μM 31 núcleos e para camptotencina 10 μM 22 núcleos

* Indica a existência de diferenças significativas entre a área do núcleo do grupo controlo solvente e a área do núcleo dos grupos tratamento.

▼ Indica a existência de diferenças significativas entre a área citoplasmática do grupo controlo solvente e a área citoplasmática dos grupos tratamento.

● Indica a existência de diferenças significativas entre a área celular no grupo controlo solvente para com a área celular dos grupos tratamento.

Relativamente à variação dos valores médios das áreas foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com camptotencina (concentrações de 5 μM e 10

μM) e o grupo controlo solvente, relativamente à área do citoplasma e da área total das células, com diminuição para cada parâmetro avaliado. Relativamente à área do núcleo foram identificadas diferenças estaticamente significativas apenas para a concentração de $5 \mu\text{M}$.

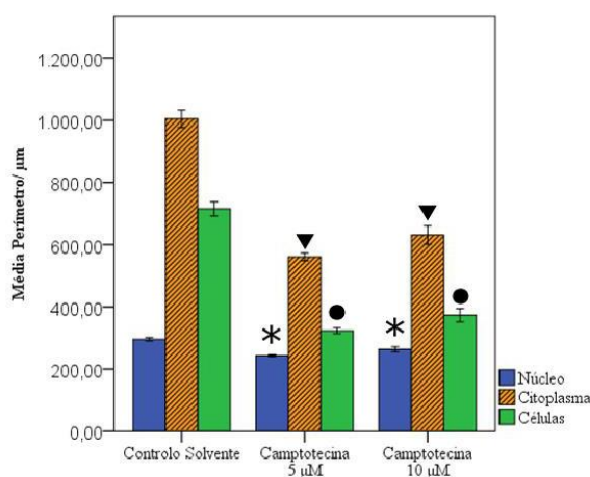


Figura 24 - Representação gráfica da média do perímetro do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e camptotecina, nas concentrações de $5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, referente à linha A549. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 62 núcleos, para camptotecina a $5 \mu\text{M}$ 31 núcleos e para camptotecina $10 \mu\text{M}$ 22 núcleos.

* Indica a existência de diferenças significativas entre o perímetro do núcleo do grupo controlo solvente e o perímetro do núcleo dos grupos tratamento.

▼ Indica a existência de diferenças significativas entre o perímetro citoplasmático do grupo controlo solvente e o perímetro citoplasmático dos grupos tratamento.

● Indica a existência de diferenças significativas entre o perímetro celular no grupo controlo solvente para com o perímetro celular dos grupos tratamento.

Relativamente à variação dos valores médios dos perímetros foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com camptotecina (concentrações de $5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$) e o grupo controlo solvente, relativamente ao perímetro celular, perímetro do núcleo e do citoplasma, com uma diminuição em cada parâmetro.

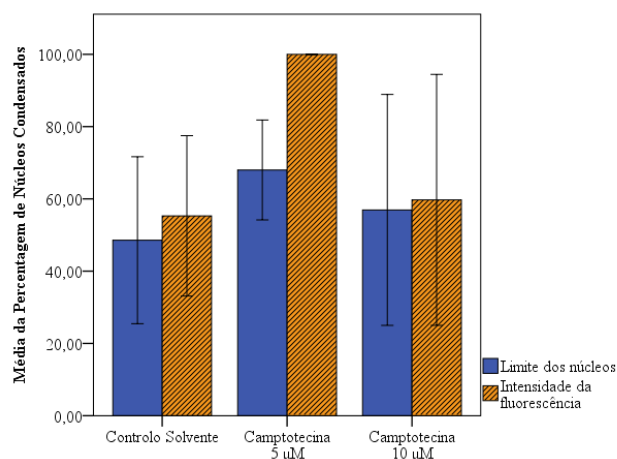


Figura 25 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e camptotecina 5 µM e 10 µM, referente à linha A549. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 62 núcleos, para camptotecina a 5 µM 31 núcleos e para camptotecina 10 µM 22 núcleos

* Indica diferenças significativas com o controlo solvente relativamente ao limite do núcleo.

Relativamente à variação dos valores médios dos limites nucleares e da intensidade de fluorescência, não foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com camptotecina (concentrações de 5 µM e 10 µM) e o grupo controlo solvente

De seguida, foram expostas a portoamidas duas linhas celulares que apresentaram características interessantes nos ensaios citotóxicos: um efeito citotóxico geral na linha MG-63 sem efeito dose-resposta, e um efeito dose-resposta forte na linha HT-29. As concentrações foram escolhidas de forma a incluir uma concentração com efeito máximo (10 µg/mL) e uma concentração perto do valor de CI50 (1,25 µg/mL ou 1,10 µg/mL).

3.3.2 - Exposição de MG-63 a portoamidas

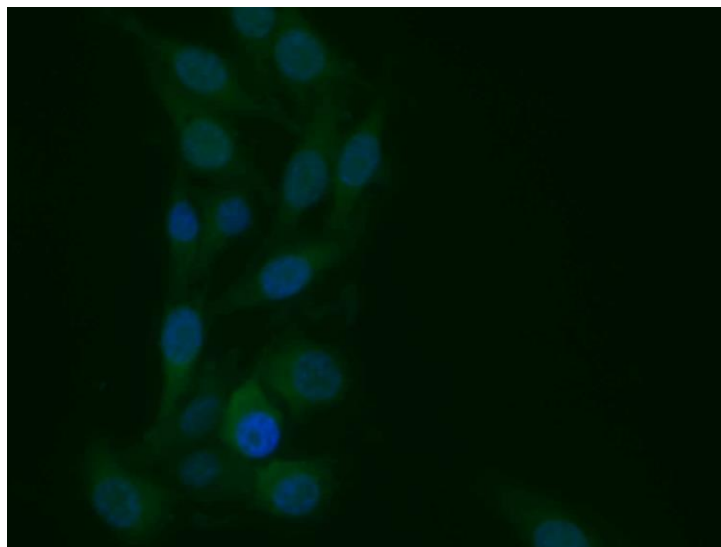


Figura 26 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha MG-63 após exposição a portoamidas, numa concentração de 1,25 µg/mL (ampliação $\times 400$). A imagem resulta na sobreposição do canal azul (marcação dos núcleos por HO), canal verde (marcação do citoplasma por Laranja de Acridina). Imagem: Image J.

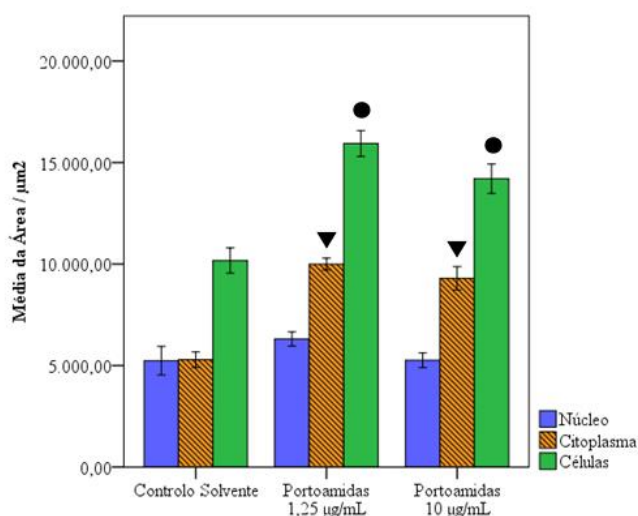


Figura 27 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha MG-63. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 93 núcleos, para portoamidas a 1,25 µg/mL 64 núcleos e para portoamidas 10 µg/mL 70 núcleos.

▼ Indica a existência de diferenças significativas entre a área citoplasmática do grupo controlo solvente e a área citoplasmática dos grupos tratamento.

● Indica a existência de diferenças significativas entre a área celular no grupo controlo solvente para com a área celular dos grupos tratamento.

Relativamente á variação dos valores médios das áreas foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com portoamidas (concentrações de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) e o grupo controlo solvente, relativamente à área do citoplasma e da área total das células, com um aumento em ambos os parâmetros. Relativamente à área do núcleo não foram identificadas diferenças estaticamente significativas.

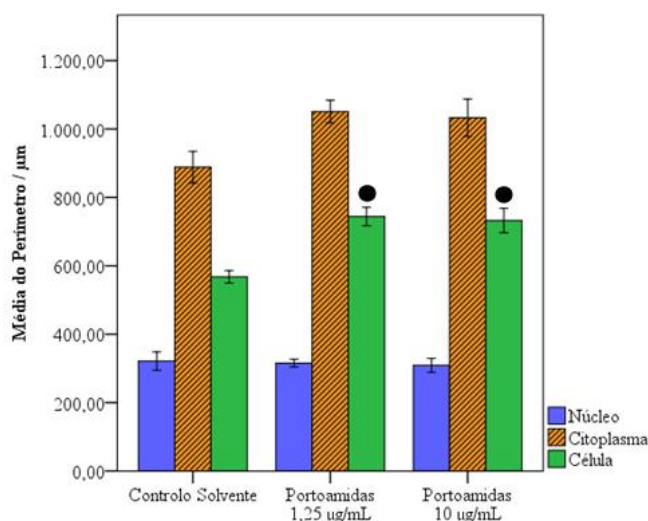


Figura 28 - Representação gráfica da média do perímetro do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, referente à linha MG-63. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 93 núcleos, para portoamidas a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ 64 núcleos e para portoamidas 10 $\mu\text{g/mL}$ 70 núcleos.

- Indica existência de diferenças significativas entre o perímetro celular no grupo controlo solvente para com o perímetro celular dos grupos tratamento.

Relativamente á variação dos valores médios dos perímetros foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com portoamidas (concentrações de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) e o grupo controlo solvente, relativamente ao perímetro celular, com um aumento em ambas as concentrações. Relativamente ao perímetro do núcleo e do citoplasma não foram identificadas diferenças estaticamente significativas.

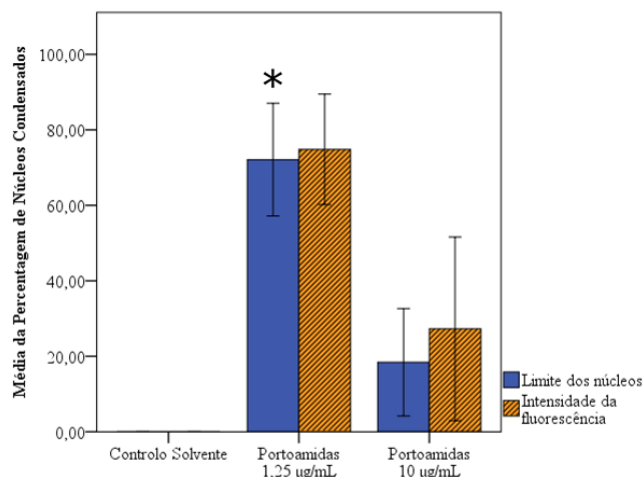


Figura 29 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e portoamidas 1,25 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha MG-63. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 93 núcleos, para portoamidas a 1,25 µg/mL 64 núcleos e para portoamidas 10 µg/mL 70 núcleos.

* Indica diferenças significativas com o controlo solvente relativamente ao limite do núcleo.

Relativamente á variação dos valores médios dos limites nucleares e da intensidade de fluorescência foram visíveis diferenças significativas entre as células tratadas com portoamidas na concentração de 1,25 µg/mL e o grupo controlo solvente.

3.3.3 - Exposição de HT-29 a portoamidas

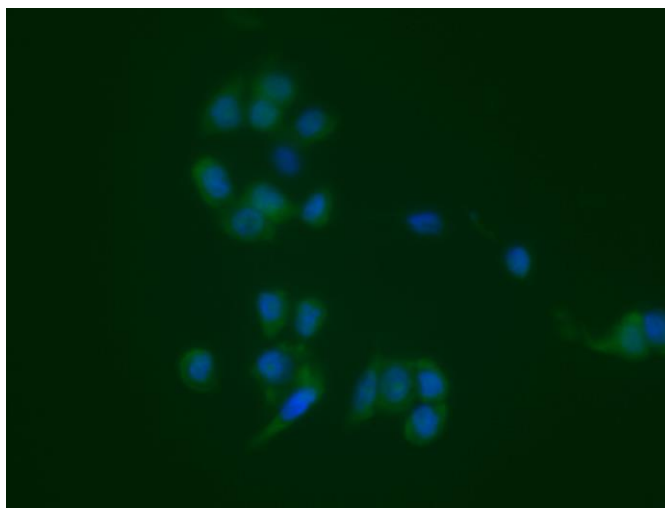


Figura 30 - Imagem de microscopia de fluorescência da linha HT-29 após exposição a portoamidas, numa concentração de 10 µg/mL (ampliação ×400). A imagem resulta na sobreposição do canal azul (marcação dos núcleos por HO), canal verde (marcação do citoplasma por Laranja de Acridina). Imagem: Image J.

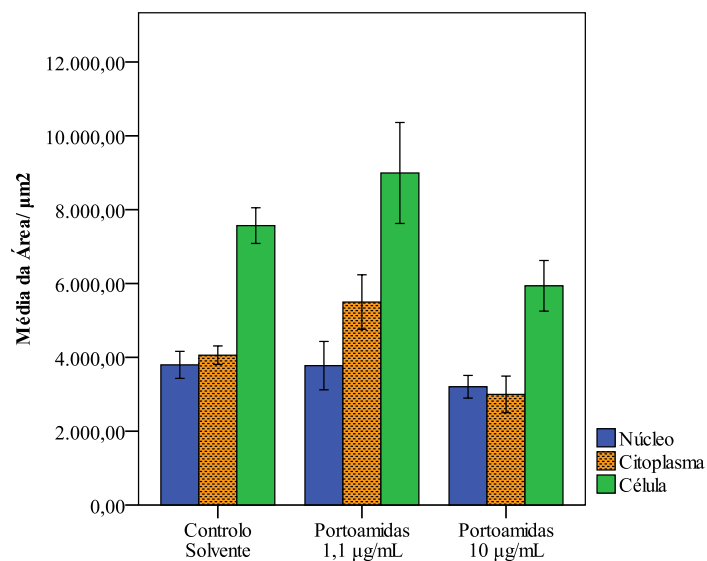


Figura 31 - Representação gráfica da média da área do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,10 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha HT-29. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 138 núcleos, para portoamidas a 1,10 µg/mL 64 núcleos e para portoamidas 10 µg/mL 51 núcleos.

Não foram visíveis diferenças significativas para nenhuma das concentrações de portoamidas relativamente ao controlo, contudo são visíveis valores mais baixos para a concentração de 10 µg/mL do que para 1,10 µg/mL

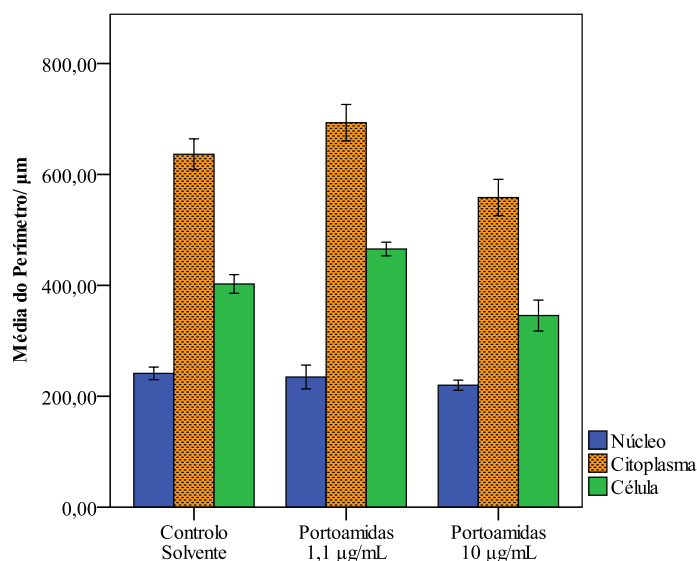


Figura 32 - Representação gráfica da média do perímetro do núcleo, citoplasma e células para o grupo controlo solvente e portoamidas, nas concentrações de 1,10 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha HT-29. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 138 núcleos, para portoamidas a 1,10 µg/mL 64 núcleos e para portoamidas 10 µg/mL 51 núcleos.

Não foram visíveis diferenças significativas para nenhuma das concentrações de portoamidas relativamente ao controlo solvente, contudo são visíveis valores mais baixos para a concentração de 10 µg/mL do que para 1,10 µg/mL

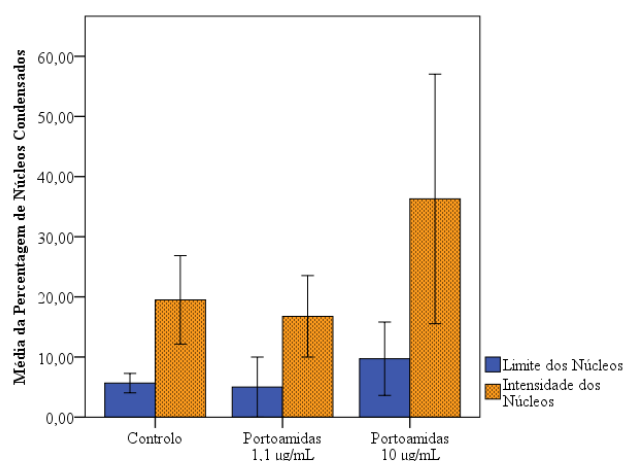


Figura 33 - Gráfico da média das percentagens do limite nuclear e intensidade de fluorescência, obtidas pelo CellProfiler, para o controlo solvente e portoamidas 1,10 µg/mL e 10 µg/mL, referente à linha HT-29. Foram avaliados, pelo CellProfiler, no controlo solvente, 138 núcleos, para portoamidas a 1,10 µg/mL 64 núcleos e para portoamidas 10 µg/mL 51 núcleos.

Não foram visíveis diferenças significativas para nenhuma das concentrações de portoamidas relativamente ao controlo solvente, contudo são visíveis valores mais elevados para a concentração de 10 µg/mL do que para 1,10 µg/mL.

3.4 – Abordagem proteómica para avaliação da citotoxicidade de portoamidas sobre HT-29

A linha HT-29 foi selecionada para caracterização por proteómica, em resultado de ter demonstrado um baixo valor de CI50 e uma forte resposta dependente da dose. Paralelamente, as alterações morfológicas e análise da apoptose por microscopia de fluorescência não mostraram quaisquer efeitos, o que pode indicar um novo mecanismo molecular de morte das células cancerígenas ou inibição da proliferação das mesmas.

3.4.1 - Extração Proteica da linha HT-29, segundo o protocolo descrito, após exposição a portoamidas

A linha HT-29 foi exposta a portoamidas nas concentrações 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL, tendo sido utilizado 0,5% de DMSO como controlo solvente. Após o período de 48 horas de exposição, foi efetuada a extração proteica, segundo o protocolo descrito. A Tabela 3 indica a quantidade de proteica extraída de cada uma das amostras.

Tabela 3 - Concentração de proteína obtida de cada uma das amostras de células da linha HT-29 expostas a portoamidas, segundo o protocolo de extração.

Amostra	[Proteína] mg/mL	Amostra	[Proteína] mg/mL	Amostra	[Proteína] mg/mL
1	5,500	7	10,980	13	13,033
2	9,247	8	13,153	14	15,664
3	12,495	9	12,993	15	13,990
4	11,140	10	25,090	16	12,435
5	18,354	11	20,845	17	20,128
6	12,635	12	37,864	18	25,867

Amostras [1,2,7,8,13,14]: HT-29 exposta a DMSO 0,5% por 48 horas

Amostras [3,4,9,10,15,16]: HT-29 exposta a portoamidas a 0,5 µg/mL por 48 horas

Amostras [5,6,11,12,17,18]: HT-29 expostas a portoamidas a 1,0 µg/mL por 48 horas.

3.4.2 - Electroforese Bidimensional dos extratos proteicos obtidos a partir das células da linha HT-29 expostas a portoamidas

Cada extrato proteico foi sujeito a electroforese bidimensional, com uma primeira fase de focagem isoelectrica seguida de SDS-PAGE. A Figura 34 mostra um exemplo para cada gel de poliacrilamida (12,5 %) obtido para extratos proteicos dos grupos controlo e tratamentos (0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL)

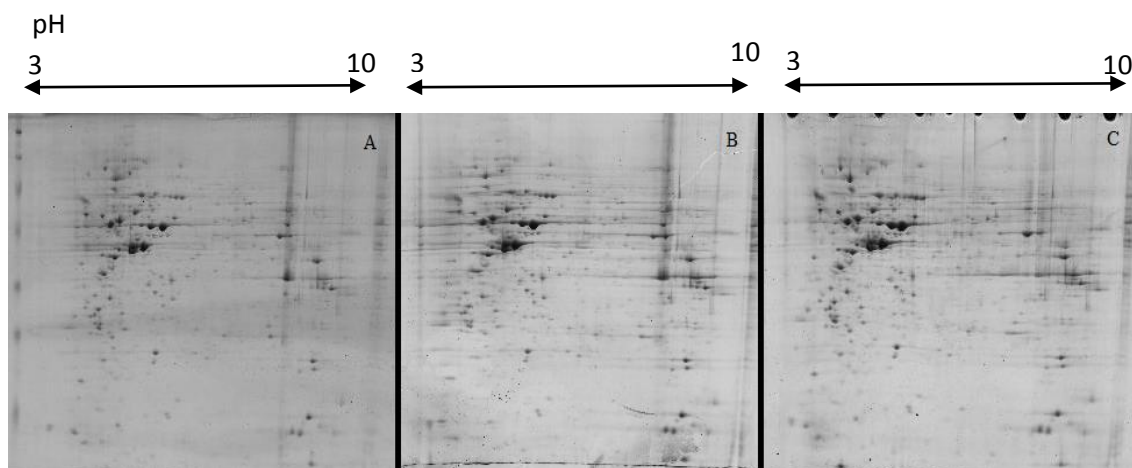


Figura 34 - Géis de poliacrilamida (12,5%) realizados para o extratos proteicos de HT-29 expostas a portoamidas. Cada gel é uma representação de um grupo de estudo: A) Células de HT-29 expostas a DMSO 0,5% (grupo controlo); B) Células de HT-29 expostas a portoamidas a uma concentração de 0,5 µg/mL; C) Células de HT-29 expostas a portoamidas a uma concentração de 1,0 µg/mL.

Cada gel de poliacrilamida obtido, num total de 18 (6 para cada grupo de estudo), foi analisado pelo *software* PDQuest (Biorad). Foram identificadas cerca de 250 *spots* por gel, tendo sido utilizado um nível de confiança de 95% para o teste-t, para posterior identificação dos *spots* diferencialmente expressos entre controlo e grupos tratamento obtendo-se um total de 30 *spots*.

Tabela 4 - Intensidade relativa dos *spots* diferencialmente expressas na linha celular HT-29, detetados pelo *software* PDQuest, com base no teste-t a 95% de confiança. Representação para cada *spot*, considerando grupos controlo e tratamentos, da média da intensidade relativa e respetivo desvio padrão.

SSP	Controlo (média ± DV)	0,5 µg/mL (média ± DV)	1,0 ug/mL (média ± DV)
304	1705,4 ± 508,7	2774,4 ± 1314,2	3176,3 ± 717,7
1202	3828,7 ± 1715,2	4983,2 ± 1576,8	5589,1 ± 912,0
1323	224,6 ± 161,8	1427,2 ± 263,0	451,1 ± 395,7
1305	4887,4 ± 1804,0	7209,3 ± 3226,9	9801,3 ± 1574,4
1401	4373,6 ± 1582,3	6207,2 ± 1851,9	6381,5 ± 627,7

SSP	Controlo (média ± DV)	0,5 µg/mL (média ± DV)	1,0 µg/mL (média ± DV)
2503	--	--	615,1 ± 333,3
2707	--	428,6 ± 319,6	347,5 ± 163,0
2902	--	11439,0 ± 1326,8	10723,1 ± 4165,0
3234	4,1 ± 0,4	38,0 ± 28,8	10,1 ± 2,2
3408	210,5 ± 130,0	715,5 ± 117,0	--
3502	135,7 ± 51,8	248,4 ± 67,9	292,9 ± 90,2
3603	603,9 ± 212,9	1004,1 ± 443,4	997,8 ± 104,2
4211	37,4 ± 15,3	396,9 ± 232,4	33,9 ± 27,2
4301	380,0 ± 312,2	801,7 ± 177,0	941,9 ± 66,4
4307	46,2 ± 8,9	239,1 ± 104,7	133,8 ± 61,9
4308	18,9 ± 13,0	123,7 ± 59,8	98,9 ± 76,7
4310	46,7 ± 29,2	--	206,2 ± 165,3
4349	25,9 ± 3,1	202,5 ± 166,3	196,9 ± 94,2
4360	16,7 ± 14,2	525,5 ± 312,1	--
4509	4,6 ± 7,0	49,1 ± 44,1	43,2 ± 41,4
4616	30,6 ± 12,9	40,3 ± 31,1	82,5 ± 55,4
4709	31,5 ± 22,6	519,3 ± 232,7	944,2 ± 932,8
4901	306,3 ± 50,8	590,7 ± 1187,9	746,1 ± 149,8
4905	234,5 ± 0,0	339,9 ± 110,9	340,8 ± 15,2
5302	2146,3 ± 498,9	3147,3 ± 635,3	2975,9 ± 405,5
5303	--	437,8 ± 395,0	--
5813	125,9 ± 57,7	--	239,5 ± 75,3
6903	497,3 ± 1,1	1579,4 ± 1088,5	2332,1 ± 822,6
6905	--	1108,0 ± 367,1	3492,4 ± 0,0
9707	--	590,7 ± 178,8	301,4 ± 0,0

A Figura 35 apresenta os géis de poliacrilamida (12,5%) obtidos para os grupos tratamento (exposição de HT-29 a portoamidas, em concentrações de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL), com indicação da posição relativa dos *spots* identificados no software PDQuest (Biorad), recorrendo ao teste-t a 95% de confiança.

Na Figura 36 encontra-se uma ampliação de um *spot* identificado no gel A da Figura 35 (6903), com uma imagem deste *spot* em cada uma das condições testadas, sendo de seguida apresentado o gráfico representativo da média da intensidade para cada condição.

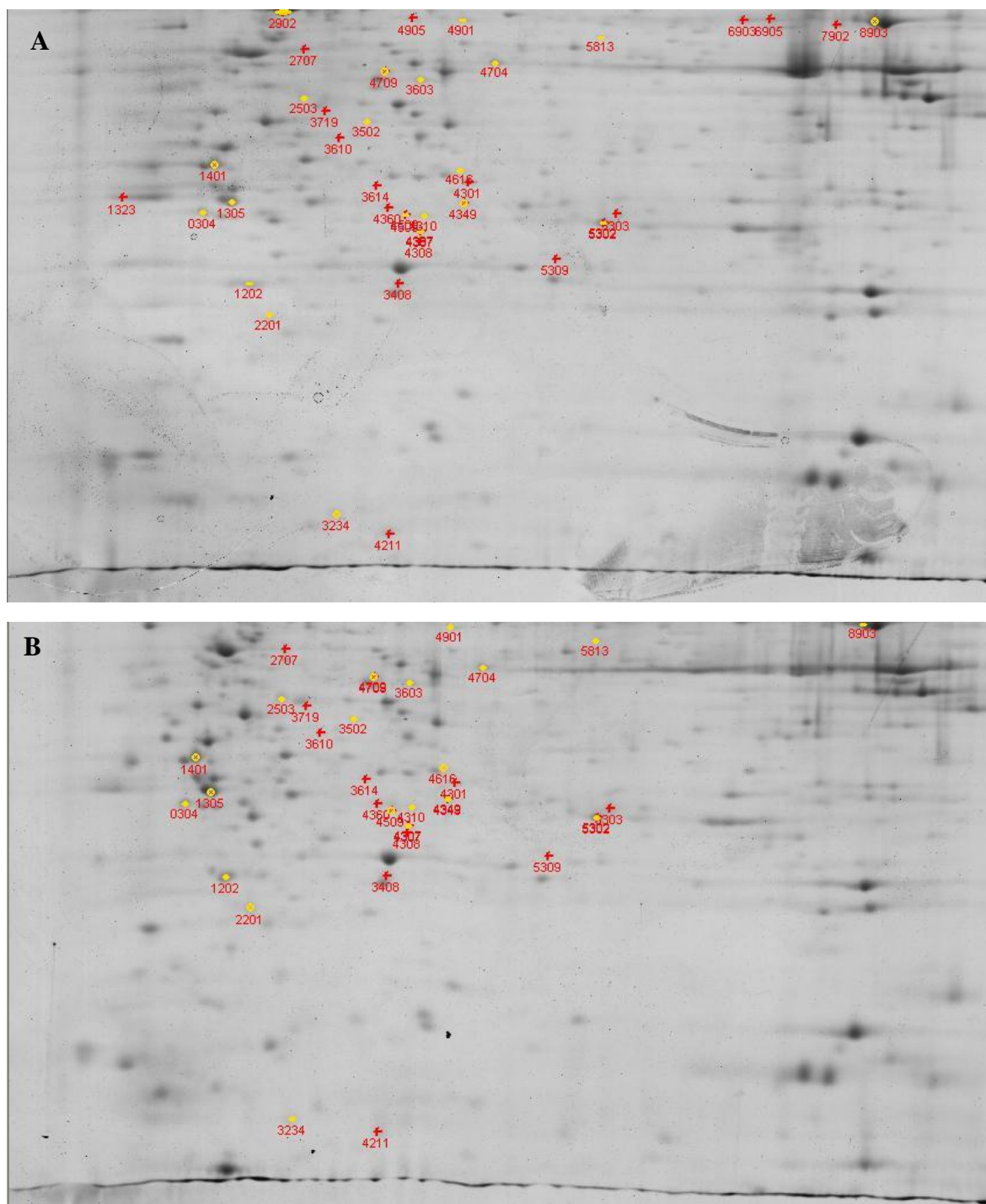
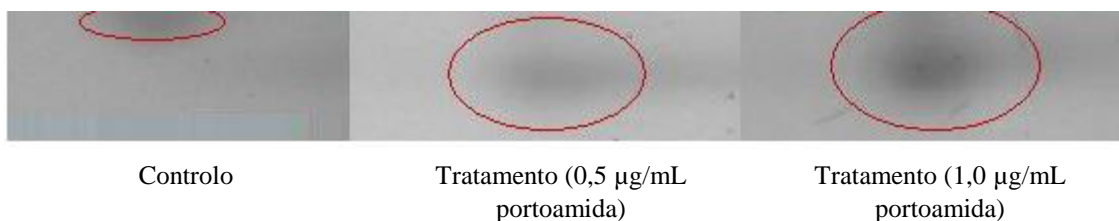


Figura 35 - Geis de poliacrilimida (12,5%) para os grupos tratamento (A – HT-29 exposta a portoamidas a 0,5 µg/mL; B- HT-29 exposta a portoamidas a 1,0 µg/mL), com indicação da posição relativa dos *spots* identificadas pelo software PDQuest, recorrendo ao teste-t com nível de confiança a 95%.

1) Spot 6903



2)

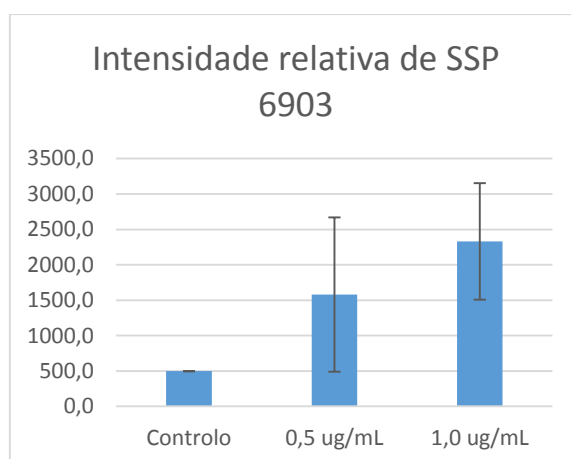


Figura 36 – Exemplo para uma proteína, nesta caso da proteína 6903, da sua intensidade relativa no grupo controlo e nos dois tratamentos. Em (1), encontra-se a representação da proteína em cada um dos grupos em estudo no géis de poliacrilamida (12,5%). Em (2) apresenta-se o gráfico representativo dos valores médios da intensidade relativa, para a proteína 6903, para grupo controlo e grupos tratamento.

3.5 - Identificação das proteínas por MALDI-TOF/TOF

De entre os 30 *spots* processados por MALDI-TOF/TOF, conseguiu-se a identificação de 14 proteínas, segundo o critério de presença em ambos os duplicados e com um intervalo de confiança de 95% para o protein score em pelo menos uma das réplicas, como descrito na metodologia. A tabela representa as proteínas identificadas e o respetivo número de acessão na base Uniprot.

(Nota: Foi ainda aceite como identificação válida uma proteína com 75% para o intervalo de confiança do protein score (RT22_HUMAN) em virtude de esta ter sido identificada em ambas as réplicas.)

Tabela 5 – Identificação das proteínas, diferencialmente expressas entre controlo e tratamentos, por MALDI-TOF/TOF. Para cada proteína é indicado o nome e o número de acessão da mesma, por comparação com a base de dados UniProt (www.uniprot.com), para além da restante informação da identificação, para cada réplica. Só foram aceites como válidas as proteínas com a mesma identificação em cada réplica e com uma das réplicas com um valor de *protein score* (C.I.) superior a 95%.

SPP	Nome da proteína	Número de acessão	Protein Score		Protein Score (C.I. %)		Total Ion Score		Total Ion Score (C.I. %)	
304	Fator de iniciação da translação eucariótica 6	IF6_HUMAN	232	162	100	100	179	109	100	100
1305	14-3-3 proteína beta/alfa	1433B_HUMAN	190	228	100	100	96	130	100	100
1323	14-3-3 proteína zeta/delta	1433Z_HUMAN	99	171	100	100	54	118	99.994	100
1401	14-3-3 proteína épsilon	1433E_HUMAN	310	240	100	100	183	136	100	100
2503	Factor de Splicing 1, rico em serina/arginina	SRSF1_HUMAN	57	45	95.848	32.661	25	5	92.058	0
2902	Queratina, tipo I, citoesqueleto	K1C19_HUMAN	80	128	99.979	100		16		0
3408	Cinase UMP-CMP	KCY_HUMAN	112	66	100	99.512	19	12	68.46	0
3719	Espermina Sintase	SPEE_HUMAN	73	82	99.905	99.967	19	18	81.833	0
4709	Transaldolase	TALDO_HUMAN	153	105	100	100	88	38	100	99.324
4308	Subunidade beta tipo-4 do proteassoma	PSB4_HUMAN	56	96	94.269	100	14	54	6.29	99.967
4310	Peroxirredoxina-4	PRXD4_HUMAN	103	85	100	99.993	68	32	100	98.13

SPP	Nome da proteína	Número de acessão	Protein Score		Protein Score (C.I %)		Total Ion Score		Total Ion Score (C.I %)	
4509	NADH desidrogenase [ubiquinona] proteína de ferro-enzofre 3, mitochondrial	NDUS3_HUMAN	60	79	97.821	99.977	6	22	0	87.577
4616	Glutathiona-S- transferase, ómega 1	GSTO1_HUMAN	64	22	99.278	0	22		84.391	
5302	Peroxirredoxina-6	PRDX6_HUMAN	135	129	100	100	86	67	100	100
5303	Subunidade alfa tipo-6 do proteassoma	PSA6_HUMAN	168	116	100	100	125	79	100	100
5813	Proteína S22 do 28S ribossomal mitochondrial	RT22_HUMAN	49	20	74.961	0	11	6	0	0
9707	Ribonucleoproteína Nuclear Heterógena A1	ROA1_HUMAN	80	30	99.977	0		21		81.424

Tendo por base as proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF, foram analisados os processos biológicos em que estas se encontram envolvidas (

Figura 37). De entre os processos identificados, verificou-se a intervenção das proteínas no metabolismo celular, regulação biológica, resposta a estímulos e organização de componentes celulares.

Também foram vistas as principais interações evidenciadas pelas proteínas identificadas, com a identificação de 3 grupos de interações principais (Figura 38).

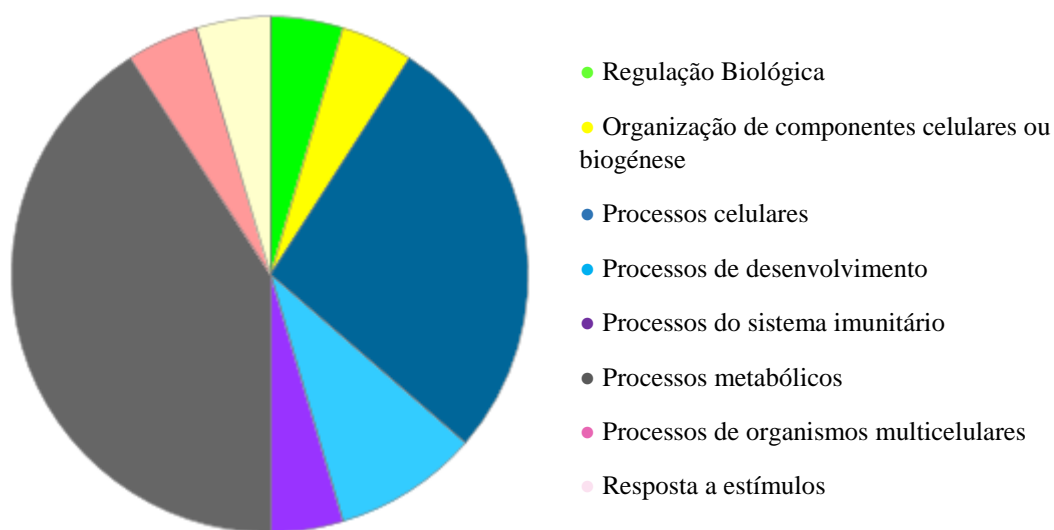


Figura 37 – Distribuição das proteínas de HT-29, identificadas por MALDI-TOF, consoante o processo biológico em que se encontram envolvidas. Dados obtidos pelo *software* PANTHER.

De entre os processos biológicos identificados, são de seguida destacados alguns com indicação das proteínas envolvidas. As proteínas estão identificadas pelo seu número de acessão, anteriormente indicado.

Regulação Biológica: GSTO1_HUMAN

Organização de componentes celulares ou biogénese: K1C19_HUMAN

Processos Celulares: GSTO1_HUMAN; ROA1_HUMAN; 1433Z_HUMAN.

Processos de desenvolvimento: ROA1_HUMAN; K1C19_HUMAN

Processos Metabólicos: GSTO1_HUMAN; ROA1_HUMAN; PSA6_HUMAN; KCY_HUMAN; SPEE_HUMAN; SRSF1_HUMAN; PSA4_HUMAN

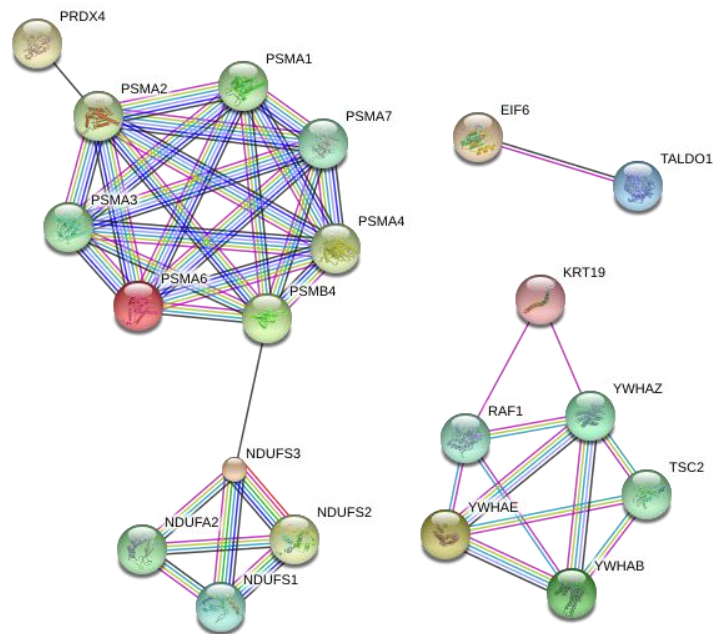


Figura 38 – Interações evidenciadas por algumas das proteínas identificadas de HT-29 por MALDI-TOF/TOF, entre elas e com outras proteínas celulares. As proteínas estão identificadas pelo gene que as codifica. Imagem obtida do software STRING. As proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF são: NDUFS3 (NADH desidrogenase); PSMB4 e PSMA6 (Subunidades beta tipo 4 e 6 do proteassoma, respetivamente); YWHAB, YWHAE e YWHAZ (proteína 14-3-3 beta/alfa, épsilon e zeta delta, respetivamente); KRT19 (queratina tipo I); TALDO1 (Transaldolase) e EIF6 (Fator de iniciação da translação eucariótica).

Aqui estão demonstradas interações que interferem com o proteossoma, com alterações ao nível mitocondrial (NDUFS3-PSMB4-PSMA6), regulação dos processos de sinalização, com mudanças na estabilidade celular (YWHAB-YWHAЕ-YWHAZ-KRT19) e aumento da expressão de uma enzima, por alteração dos níveis de fatores de translação (TALDO1-EIF6).

DISCUSSÃO

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Padrão de citotoxicidade de portoamidas sobre diferentes linhas cancerígenas

Antes de expor as linhas celulares a portoamidas, foi necessário avaliar a citotoxicidade do DMSO sobre as linhas celulares, na medida em que este é o solvente utilizado na diluição das portoamidas. Como visto na Figura 13 é visível que diferenças significativas são visíveis para valores superiores a 0,63%. Contudo na linha HT-29 e MG-63 são visíveis diferenças significativas para 0,16% de DMSO, porém estes resultados devem resultar de erros experimentais, pois em concentrações superiores as diferenças não são visíveis. Assim, nos ensaios de exposição a portoamidas, foi utilizado uma concentração de DMSO de 0,5%, tanto para a diluição das portoamidas, como para o controlo solvente. Apesar de não se ter realizado o ensaio de MTT para todas as linhas em estudo, em resultado da similaridade de resultados foi escolhida a mesma concentração de DMSO para todas as linhas.

Inicialmente avaliou-se o padrão de citotoxicidade de portoamidas sobre as linhas HT-29, RKO, A549, T-47D, HepG2 MG-63, SH-SY5Y, tendo sido verificado que a citotoxicidade do composto não é igual para todas as linhas em estudo. De todas as linhas testadas apenas três tiveram variações de absorvância significativas para as diferentes concentrações de portoamidas: RKO, HT-29 e MG-63. As restantes linhas não tiveram variações significativas da absorvância para as diferentes concentrações de portoamidas testadas. O ensaio do MTT pressupõe a metabolização do MTT pela mitocôndria, ao nível de uma reductase mitocondrial, sendo o valor de absorvância obtido proporcional á quantidade de células obtidas (maior número de células, maior metabolização de MTT, valor de absorvância maior) [60].

Como evidenciado, as linhas com fraco efeito citotóxico de portoamidas (A549, T-47D, SH-SY5Y e HepG2), evidenciaram apenas uma ligeira diminuição dos valores de absorvância para a maior concentração de portoamidas (10 µg/mL), relativamente ao controlo. Tal facto, não pressupõe uma ausência de citotoxicidade do composto sobre a linha, mas sim que as concentrações utilizadas eram demasiado baixas para terem efeito sobre a linha.

Pelos resultados obtidos (Figura 15, Figura 17, Figura 19) as linhas H-29, MG-63 e RKO evidenciaram efeito citotóxico pronunciado, dentro da gama de concentrações utilizada, o que indica uma ação de portoamidas sobre certas linhas celulares. É importante realçar, que o efeito citotóxico é mais visível, nas 3 linhas, para os ensaios num período 48 horas, isto resulta do maior tempo de exposição ao composto, o que permite uma maior diferença dentro da gama de concentrações.

A linha MG-63 não evidenciou um padrão citotóxico pela ação das portoamidas, mas sim uma diminuição da absorvância em todas as concentrações testadas, relativamente ao controlo, com uma diminuição da viabilidade celular para cerca de 33%, em 48 horas de exposição.

A linha RKO evidenciou uma citotoxicidade menor do que HT-29, em resultado do seu valor de CI50 ser superior ao de HT-29, 1,336 µg/mL, com 90% de inibição relativamente ao controlo solvente, e 0,4395 µg/mL, com 60% de inibição relativamente ao controlo solvente, respetivamente, para o período de 48 horas.

Contudo, os resultados obtidos, tanto podem ser uma indicação de citotoxicidade ou proliferação celular reduzida. O ensaio de MTT não consegue fazer a distinção entre os dois fenómenos. Caso se quisesse distinguir qual o mecanismo subjacente aos resultados obtidos, seria necessário realizar um ensaio direcionado para a proliferação celular.

Um aspeto a ter em conta, tendo por base os resultados da identificação por MALDI-TOF/TOF, é a necessidade de outro tipo de ensaios enzimáticos para avaliar a viabilidade celular. Algumas proteínas identificadas apresentam, direta ou indiretamente, ação sobre a mitocôndria, sendo o ensaio do MTT baseado na atividade de uma enzima mitocondrial, como anteriormente visto. Assim, ensaios com enzimas citosólicas, como o ensaio da Lactato desidrogenase (LDH), em que se avalia a atividade da enzima [61], surgem como uma alternativa de confirmação dos resultados de citotoxicidade obtidos de portoamidas sobre as diferentes linhas celulares testadas.

Tendo por base os resultados obtidos para os ensaios de MTT foi escolhida a linha HT-29 para o ensaio de exposição a portoamidas, em resultado da sua maior uniformidade no padrão de citotoxicidade, relativamente a RKO. Para o ensaio final foram escolhidas as concentrações de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL, em resultado da primeira concentração ser

próximo de CI50 de HT-29, enquanto a concentração de 1,0 µg/mL, representa sensivelmente o dobro de CI50 de HT-29, tendo um efeito citotóxico mais pronunciado. Paralelamente, para o estudo de alterações morfológicas, foram escolhidas as linhas HT-29 e MG-63, em resultado dos resultados obtidos pelo ensaio de MTT, e do diferente nível de citotoxicidade evidenciado em cada linha.

4.2 - Alterações da Morfologia Celular visíveis por microscopia de fluorescência após exposição a camptotencina e portoamidas

4.2.1 - Exposição de 549 a camptotencina

Inicialmente, de forma a ver alguns dos efeitos evidenciados no processo de apoptose, a linha A549 foi exposta a camptotencina, composto modelo, indutor de apoptose, em duas concentrações de 5 µM e 10 µM. Foram visíveis diminuições tanto na área como no perímetro, para o núcleo, o citoplasma e a célula. Isto reflete fenómenos envolvidos no processo de apoptose como a contração celular, e a condensação dos núcleos [10]. Contudo não foram visíveis diferenças estaticamente significativas ao nível do limite nuclear e intensidade de fluorescência.

4.2.2 – Exposição de MG-63 e HT-29 a portoamidas

Para avaliar as alterações na morfologia celular das linhas MG-63 e HT-29 após exposição a portoamidas recorreu-se à técnica de microscopia de fluorescência. As duas linhas foram expostas a duas concentrações de portoamidas, tendo por base os resultados dos ensaios de viabilidade celular anteriormente realizados. A concentração de 1,10 ou 1,25 µg/mL são sensivelmente o dobro do valor de CI50 para a linha HT-29, e com atividade em MG-63, enquanto 10,0 µg/mL é a maior concentração testada nos ensaios de viabilidade celular.

Para a linha MG-63, foram visíveis diferenças significativas na área do citoplasma e das células comparativamente ao controlo solvente (Figura 27), e para o perímetro celular em relação ao controlo solvente (Figura 28). Em ambos os casos, verifica-se que estes valores são superiores ao do controlo solvente, o que pressupõe um mecanismo de citotoxicidade diferente daquele provocado pelo composto modelo de apoptose na linha A549. Um importante dado a retirar é que a diminuição da viabilidade celular provocada por portoamidas, resultado de um mecanismo distinto da necrose, pois não é visível o sinal de

fluorescência provocado pelo iodeto de propídeo, composto que se intercala com o ADN em situações de necrose [51].

Um outro aspeto avaliado foi a condensação dos núcleos, tendo por base dois parâmetros: limites e intensidade de fluorescência dos núcleos. Foi visível na concentração mais baixa utilizada de portoamidas, 1,25 µg/mL, diferenças significativas para o controlo solvente para a condensação dos núcleos, com um aumento do valor, o que pode ser um indício do processo de apoptose celular.

Para a linha HT-29 não foram observáveis efeitos significativos. Isto indica a ausência de efeitos anormais na morfologia celular, tendo em conta o tamanho e o perímetro do citoplasma, núcleo e células, bem como nenhum efeito na apoptose indicado pela condensação dos núcleos.

Este facto demonstra que o mecanismo molecular, envolvido na ação das portoamidas, não é totalmente conhecido, necessitando de maior investigação na área proteómica.

4.3 – Expressão diferencial de proteínas de HT-29 após exposição a portoamidas

Como visível pela Tabela 4 foi obtido um total de 30 *spots* diferencialmente expressos, entre controlo e tratamentos, para o ensaio de exposição de HT-29 a portoamidas. Por MALDI-TOF/TOF foram identificadas 17 proteínas, tendo por base os critérios anteriormente definidos, o que representa uma taxa de sucesso de cerca de 57%. Das 17 proteínas identificadas verificou-se que a maioria intervém em processos biológicos relacionados com o metabolismo celular, sinalização, regulação celular e atividade mitocondrial.

Dentro do grupo de interações proteicas evidenciado na Figura 38 é visível uma relação entre a NADH desidrogenase e as subunidades do proteassoma, alfa do tipo 6 e beta do tipo 4. A NADH desidrogenase identificada pertence ao complexo 1 da cadeia respiratória da mitocôndria, sendo mais um elemento importante na oxidação de substratos para a geração de ATP [62], em associação com os restantes complexos constituintes da cadeia respiratória e identificados na Figura 38 (NDUFA2; NDUFS2;NDUFS1).

O proteassoma é uma protéase responsável pela clivagem de vários péptidos, conduzindo a sua degradação [63]. As duas subunidades identificadas são uma parte constituinte do

proteossoma, como visível pelas restantes identificadas na Figura 38 (PSMA1; PSMA2; PSMA3; PSMA4; PSMA6; PSMA7; PSMB4). As duas proteínas ligadas ao proteossoma encontram-se sobre-expressas nos tratamentos, sendo a que a subunidade beta só que encontra mesmo expressa no grupo tratamento exposto a concentração de 0,5 µg/mL de portoamidas. Este fato revela a degradação do complexo do proteossoma nas suas subunidades, atuando com uma inibição do mesmo, sendo este fato largamente estudado como um mecanismo de estimulação da apoptose de células cancerígenas [64]. Como sabido, o proteossoma controla o processo da apoptose controlando o nível de proteínas pro e anti apoptóticas presentes [43], a inibição do proteossoma, neste caso com degradação do mesmo, conduz á diminuição de proteínas anti-apópticas, com aumento das pro-apópticas. Paralelamente, a NADH desidrogenase do complexo I encontra-se sobre-expressa nos grupos tratamento, o que reflete alterações ao nível mitocondrial, que conduzem ao processo de apoptose, neste caso, despoletada pela via mitocondrial. A sobre-expressão do complexo I mitocondrial também reflete o aumento da expressão de espécies reativas de oxigénio, outro mecanismo envolvido no processo de apoptose [65]. A degradação do proteossoma e os aumentos dos níveis citosólicos do complexo I mitocondrial refletem processos envolvidos na morte celular por apoptose, concretamente a via intrínseca [40]. A sobre-expressão de proteínas constituintes do ribossoma mitocondrial também reflete a ação de aumento da síntese proteica, com alterações sobre a mitocôndria, sendo neste caso com o aumento da expressão da proteína S22 do ribossoma 28s da mitocôndria [66].

Outro conjunto de interações evidenciadas é a entre a família de proteínas 14-3-3 e a queratina 19. As proteínas 14-3-3 encontram-se sobre-expressas nos tratamentos, relativamente ao controlo, sendo proteínas envolvidas em processos de sinalização celular [67], enquanto a queratina 19 só se encontra expressa nos grupos tratamento, e tem função de manter a integridade estrutural celular [68]. A sobre-expressão da família de proteínas 14-3-3 reflete alterações nos processos de sinalização, concretamente na apoptose. Esta família de proteínas está relacionada com a chamada via de Hippo, via responsável pela proliferação celular, bem como pelo processo de apoptose (revisto em [69]), sendo que alterações nos níveis dos intervenientes desta via conduzem, em vários casos, ao desenvolvimento de carcinomas. Paralelamente é sabido que as proteínas 14-3-3 interagem com as queratinas do tipo I, onde a queratina 19 se encontra incluído, regulando a sua

distribuição celular e a sua habilidade de formarem filamentos [70]. De entre os processos biológicos em que se encontram envolvidas, as proteínas 14-3-3 atuam sobre a mitocôndria, controlando a sua permeabilização e inserção de moléculas na membrana mitocondrial. Esta família de proteínas também tem uma ação sobre a morte celular programada, em resultado dos processos de sinalização em que se encontra envolvido. A queratina 19 tem sua expressão aumentada numa grande gama de cânceres [71], encontrando-se elevada nas células cancerígenas em estudo (HT-29). Desta forma poderá ser verificada aqui uma ação das proteínas 14-3-3 (beta/alfa, zeta/delta e épsilon) sobre a queratina 19, causando a sua inativação e impedindo o seu contributo para a sobrevivência das células tumorais.

Por análise da Figura 38, relativamente à família de proteínas 14-3-3 e a queratina 19, identificadas por MALDI-TOF/TOF, é visível a interação com a proteína RAF1_HUMAN, uma proteína que codifica uma cinase crucial na regulação do crescimento celular e diferenciação, por ação sobre a via Raf1/MEK/ERK [72]. Em virtude das proteínas 14-3-3 serem cruciais nos processos de sinalização celular e a queratina ser responsável pela manutenção da estrutura celular, como anteriormente visto, torna-se facilmente compreensível a ação desta cinase, em conjunto com as proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF, no controlo da viabilidade celular. Por outro lado também é observável a interação das proteínas 14-3-3 com a proteína TSC2_HUMAN, uma proteína conhecida como um supressor tumoral [73]. Tal facto resulta dos processos de sinalização em que esta família de proteínas se encontra envolvida, sendo a ação sobre este supressor tumoral um exemplo deste fenómeno.

A terceira interação visível, entre as proteínas identificadas, prende-se com a interação entre o fator de iniciação de translação e a transaldolase. Os fatores de iniciação de translação são moléculas de extrema importância no processo de regulação da translação do mRNA para proteína [74], enquanto a transaldolase é uma enzima central na via não oxidativa das pentoses de fosfato [75]. Ambas as proteínas se encontram sobre-expressas nas condições de tratamento, a sua interação resulta em como os fatores de translação controlam a síntese proteica, este fator controla a síntese da enzima transaldolase, controlando a sua expressão celular. Como sabido células cancerígenas utilizam processos não oxidativos para produção de energia, em resultado da maior velocidade de produção que estas apresentam [76]. Paralelamente a isto, em resultado do processo de apoptose, no

caso concreto com alterações ao nível da mitôcondria, os processos não oxidativos são aumentados na célula numa tentativa de repor os níveis energéticos da mesma, sendo a via controlada pela transaldolase um exemplo disso [75].

Analisando as restantes proteínas, pode-se analisar a sobre-expressão dos níveis de peroxirredoxinas, moléculas responsáveis pelo controlo dos níveis de peróxido de hidrogénio [77]. Um dos principais mecanismos envolvidos ao nível da morte celular é o *stress* oxidativo, com a produção de radicais, como o peróxido de hidrogénio [58]. O aumento da expressão de peroxirredoxinas é um dos mecanismos usados, a nível celular, para controlar este aumento de radicais, numa tentativa de combater a morte celular [77].

O aumento da expressão da espermina sintase, conduz ao aumento de espermina, uma poliamina que existe naturalmente nas células [78]. Contudo aumentos celulares destas moléculas são citotóxicos para os organismos, interferindo em processos como a síntese proteica [78]. Tal fato reforça o efeito citotóxico de portoamidas, em virtude do aumento da expressão de espermina, que contribui para a morte celular.

A cinase UMP-CMP é responsável pela fosforilação de UMP e CMP [79], com gasto de ATP, encontrando-se sobre-expressa na linha de HT-29 exposta a 0,5 µg/mL. O aumento da expressão desta cinase traduz-se num aumento da fosforilação de UMP e CMP, sendo estes nucleósidos extremamente importante na síntese *de novo* dos nucleótidos de pirimidina constituintes do ADN [80]. O fato de não se verificar expressão desta cinase, na maior concentração de portoamidas, pode ser explicado pela maior toxicidade a que as células estão expostas, que diminui a quantidade de energia disponível, verificando-se uma ausência da expressão da enzima em questão.

A glutathione-S-transferase é uma enzima responsável pela conjugação da glutathione com uma variedade de compostos celulares [81]. Esta enzima encontra-se envolvida na resposta xenobiótica, neste caso a portoamidas, em que esta enzima associado a outras, procura degradar os compostos invasores do organismo [82]

Por fim também se verificou a expressão da ribonucleoproteína nuclear heterógena A1 (hnRNP A1), enquanto esta se encontrou ausente no controlo. A hnRNP A1 é uma proteína responsável pelo transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, estando envolvido na modulação do processo de *splicing* [83]. Esta proteína também está envolvida no processo

de apoptose, concretamente na via controlada por recetor, na medida em que foi comprovada que a sobre-expressão desta proteína estimula a síntese molécula ativa do Fas que se ligará ao FasL [84], fazendo com que a célula entre em apoptose. Este facto mostra que não é apenas a via mitocondrial de ativação da apoptose que está presente, mas sim, uma conjugação também com a via extrínseca, como anteriormente demonstrado. A conjugação destas duas vias estimula o sinal de apoptose, fazendo com que este seja mais intenso nas células, acelerando o processo.

4.5 – Conclusões

As portoamidas, cultivadas e eficazmente isoladas por HPLC, exibiram uma atividade citotóxica diferenciada sobre as linhas celulares testadas, demonstrado que o composto não apresenta uma ação semelhante sobre todas as linhas. A citotoxicidade do composto foi visível nas linhas RKO, MG-63 e HT-29. Um dos factos de maior realce prende-se com o efeito dose-resposta sobre duas linhas do cancro do cólon, RKO e HT-29, o que realça o efeito citotóxico específico de portoamidas.

A microscopia de fluorescência permitiu observar os efeitos morfológicos a nível celular despoletados pelo composto. Mesmo dentro de linhas com efeito citotóxico por parte de portoamidas, foram observáveis diferentes respostas, o que reflete uma ação diferenciada sobre cada linha testada. As portoamidas atuaram ai nível do citoplasma da linha MG-63, sendo que na linha HT-29 não foram visíveis efeitos.

Por fim, as proteínas identificadas por espectrometria de massa, permitiram entender alguns dos processos biológicos subjacentes à citotoxicidade provocada por portoamidas, na linha HT-29. A sobre-expressão de proteínas relacionadas com a apoptose (proteínas 14-3-3 beta/alfa, zeta/delta e épsilon), tanto ao nível da sua regulação como sinalização, mostra o despoletar da morte celular pela ação do composto. A expressão de proteínas relacionadas com a regulação e organização mitocondrial (NADH desidrogenase), revelam que a via de ativação do processo apoptótico, é via intrínseca. O aumento de expressão de proteínas ligadas ao proteassoma, podem conduzir a uma baixa presença do próprio proteassoma, portanto o domínio de proteínas pro-apoptóticas. Contudo a sobre-expressão de uma proteína relacionada com a via extrínseca, a hnRNP A1, revela uma conjugação

das duas vias de ativação da apoptose, como forma de exponenciar o sinal de apoptose na célula.

4.4 – Perspetivas Futuras

Mediante os resultados obtidos existem metodologias que poderão ser utilizadas de forma a confirmar os dados obtidos e conseguir nova informação que possibilite compreender melhor o mecanismo citotóxico de portoamidas.

Baseado nos dados obtidos será importante confirmar qual o mecanismo efetivamente presente na citotoxicidade das portoamidas a nível celular. Assim, poderá se recorrer á genómica, avaliando-se o nível de expressão de genes envolvidos no ciclo celular, com especial interesse em genes envolvidos no processo de apoptose. Uma das técnicas que poderia ser usado seria a técnica de RT-PCR em tempo real. Poderia se avaliar a expressão de alguns genes que codificam proteínas identificadas como alteradas no processo: a família de proteínas 14-3-3, proteassoma, entre outras. A técnica de RT-PCR em tempo real possibilitará amplificar segmentos do ARN, envolvidos no ciclo celular, por exemplo, permitindo avaliar se sequências dos mesmos apresentam alterações relativamente a situações controlo [85]. Esta técnica possibilitará avaliar sequências de ARN e verificar alterações que estas apresentem, em resultado da administração de portoamidas.

Uma outra técnica que poderá ser utilizada é a citometria de fluxo que permitirá fazer um estudo comparativo entre as células cancerígenas sem tratamento e com tratamento pelas portoamidas. O uso desta técnica permite a análise do ciclo celular, e variações do material genético [53], por exemplo, bem como da análise do processo da apoptose, permitindo avaliar a degradação do ADN e avaliação do nível de apoptose presente nas células (estágio inicial ou final), distinguindo-o da necrose [86].

Por fim, outra abordagem possível, seria outros ensaios que analisassem a apoptose, como a análise das caspases [87].

5 - BIBLIOGRAFIA

1. Erwin PM, López-Legentil S, Schuhmann PW. The pharmaceutical value of marine biodiversity for anti-cancer drug discovery. *Ecol Econ. Elsevier B.V.*; 2010 Dec;70(2):445–51.
2. Leão PN, Pereira AR, Liu W-T, Ng J, Pevzner P a, Dorrestein PC, König GM, Vasconcelos VM, Gerwick WH. Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 22;107(25):11183–8.
3. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):69–85.
4. Nastrucci C, Cesario A, Russo P. Anticancer drug discovery from the marine environment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2012 May 1;7(2):218–32.
5. Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther. Elsevier Inc.*; 2013 May;138(2):255–71.
6. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
7. Uzair B, Tabassum S, Rasheed M, Rehman SF. Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance. *ScientificWorldJournal*. 2012 Jan;2012:179782.
8. Gupta V, Ratha SK, Sood A, Chaudhary V, Prasanna R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—Prospects and challenges. *Algal Res. Elsevier B.V.*; 2013 Mar;2(2):79–97.
9. Latysheva N, Junker VL, Palmer WJ, Codd G a, Barker D. The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Bioinformatics*. 2012 Mar 1;28(5):603–6.
10. Thangam R, Suresh V, Asenath Princy W, Rajkumar M, Senthilkumar N, Gunasekaran P, Rengasamy R, Anbazhagan C, Kaveri K, Kannan S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2013 Sep 1;140(1-2):262–72.

11. Mevers E, Liu W-T, Engene N, Mohimani H, Byrum T, Pevzner P a, Dorrestein PC, Spadafora C, Gerwick WH. Cytotoxic veraguamides, alkynyl bromide-containing cyclic depsipeptides from the marine cyanobacterium cf. *Oscillatoria margaritifera*. *J Nat Prod*. 2011 May 27;74(5):928–36.
12. Balaji S, Gopi K, Muthuvelan B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Res. Elsevier B.V.*; 2013 Jul;2(3):278–85.
13. Tan LT. Pharmaceutical agents from filamentous marine cyanobacteria. *Drug Discov Today. Elsevier Ltd*; 2013 Sep;18(17-18):863–71.
14. Nagarajan M, Maruthanayagam V, Sundararaman M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *J Appl Toxicol*. 2012 Mar;32(3):153–85.
15. Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry*. 2007 Apr;68(7):954–79.
16. Welker M, von Döhren H. Cyanobacterial peptides - nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*. 2006 Jul;30(4):530–63.
17. Vawhal P, Rajavel R, Mute V, Awari D. Screening of Antineoplastic Activity of *Oscillatoria Annae* against Diethyl Nitrosamine Induced Cancer in Rats. 2011;3(7):1354–9.
18. Leão PN, Ramos V, Vale M, Machado JP, Vasconcelos VM. Microbial community changes elicited by exposure to cyanobacterial allelochemicals. *Microb Ecol*. 2012 Jan;63(1):85–95.
19. Leflaive J, Ten-Hage L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw Biol*. 2007 Feb;52(2):199–214.
20. John U, Beszteri B, Derelle E, Van de Peer Y, Read B, Moreau H, Cembella A. Novel insights into evolution of protistan polyketide synthases through phylogenomic analysis. *Protist*. 2008 Jan;159(1):21–30.
21. An T, Kumar TKS, Wang M, Liu L, Lay JO, Liyanage R, Berry J, Gantar M, Marks V, Gawley RE, Rein KS. Structures of pahayokolides A and B, cyclic peptides from a *Lyngbya* sp. *J Nat Prod*. 2007 May;70(5):730–5.
22. Jemal A, Bray F, Center M. Global cancer statistics. *CA a cancer J* 2011;61(2):69–90.
23. Roychoudhuri R, Robinson D, Putcha V, Cuzick J, Darby S, Møller H. Increased cardiovascular mortality more than fifteen years after radiotherapy for breast cancer: a population-based study. *BMC Cancer*. 2007 Jan;7:9.

24. Li X, Roginsky a B, Ding X-Z, Woodward C, Collin P, Newman R a, Bell RH, Adrian TE. Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer and the anti-apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, Frondoside A. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Sep;1138:181–98.
25. Li X, Liu W, Dong B, Sheng L, Ren H, Han Z, Lu T, Liang P. Identification of serum biomarkers for lung cancer using protein mass spectrometry. *Mol Med Rep.* 2012 Sep;6(3):531–4.
26. Kang U-B, Yeom J, Kim H-J, Kim H, Lee C. Expression profiling of more than 3500 proteins of MSS-type colorectal cancer by stable isotope labeling and mass spectrometry. *J Proteomics. Elsevier B.V.;* 2012 Jun 6;75(10):3050–62.
27. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science (80-).* 1956;123(3191):309–14.
28. Wong N, De Melo J, Tang D. PKM2, a Central Point of Regulation in Cancer Metabolism. *Int J Cell Biol.* 2013 Jan;2013(Figure 1):242513.
29. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta. Elsevier B.V.;* 2011 Jun;1807(6):620–5.
30. Liou S-F, Lin H-H, Liang J-C, Chen I-J, Yeh J-L. Inhibition of human prostate cancer cells proliferation by a selective alpha1-adrenoceptor antagonist labedipinedilol-A involves cell cycle arrest and apoptosis. *Toxicology.* 2009 Feb 4;256(1-2):13–24.
31. Hanahan D, Weinberg R a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell. Elsevier Inc.;* 2011 Mar 4;144(5):646–74.
32. Van der Zee J a, van Eijck CHJ, Hop WCJ, van Dekken H, Dicheva BM, Seynhaeve ALB, Koning G a, Eggermont AMM, ten Hagen TLM. Angiogenesis: a prognostic determinant in pancreatic cancer? *Eur J Cancer. Elsevier Ltd;* 2011 Nov;47(17):2576–84.
33. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131–49.
34. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007 Feb;17(1):60–5.
35. Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Aug;5(4):366–73.

36. Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2007;10(1-2):13–29.
37. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2007 Oct;19(5):488–96.
38. Rath G, Schneider C, Dedieu S. The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin-and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *BBA Mol Cell Res*. 2006;1763:1125–34.
39. O'Brien M a., Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care*. 2008 Dec;18(6):572–85.
40. Cheng A-C, Lee M-F, Tsai M-L, Lai C-S, Lee JH, Ho C-T, Pan M-H. Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Food Chem Toxicol*. Elsevier Ltd; 2011 Feb;49(2):485–93.
41. Fan C-F, Xu H-T, Lin X-Y, Yu J-H, Wang E-H. A multiple marker analysis of apoptosis-associated protein expression in non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011 Jan;49(2):231–9.
42. Hector S, Prehn JHM. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta*. Elsevier B.V.; 2009 Apr;1795(2):117–29.
43. Arlt A, Muerköster SS, Schäfer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2013 May 28;332(2):346–58.
44. Martín-Garabato E, Martínez-Arribas F, Pollán M, Lucas a R, Sánchez J, Schneider J. The small variant of the apoptosis-associated X-chromosome RBM10 gene is co-expressed with caspase-3 in breast cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2008;5(3-4):169–73.
45. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb;88(3):355–65.
46. Kalungi S, Wabinga H, Bostad L. Expression of apoptosis associated proteins Survivin, Livin and Thrombospondin-1 in Burkitt lymphoma. *APMIS*. 2013 Mar;121(3):239–45.
47. Gryko M, Pryczynicz a, Guzińska-Ustymowicz K, Kamocki Z, Zaręba K, Kemon a, Kędra B. Immunohistochemical assessment of apoptosis-associated proteins: p53, Bcl-xL, Bax and Bak in gastric cancer cells in correlation with clinical and pathomorphological factors. *Adv Med Sci*. 2012 Jun 1;57(1):77–83.

48. Zhao J, Lu Y, Shen H-M. Targeting p53 as a therapeutic strategy in sensitizing TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett.* Elsevier Ireland Ltd; 2012 Jan 1;314(1):8–23.
49. Wang G, Ahmad K a, Harris NH, Ahmed K. Impact of protein kinase CK2 on inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2008 Sep;316(1-2):91–7.
50. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55–63.
51. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry.* 1994 Sep 1;17(1):59–65.
52. Rieger AM, Hall BE, Luong LT, Schang LM, Barreda DR. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *J Immunol Methods.* Elsevier B.V.; 2010 Jun 30;358(1-2):81–92.
53. Chan LL, Wilkinson AR, Paradis BD, Lai N. Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. *J Fluoresc.* 2012 Sep;22(5):1301–11.
54. Mathivanan S, Ji H, Tauro BJ, Chen Y-S, Simpson RJ. Identifying mutated proteins secreted by colon cancer cell lines using mass spectrometry. *J Proteomics.* Elsevier B.V.; 2012 Dec 5;76 Spec No:141–9.
55. Whelan S, He J, Lu M. Mass Spectrometry (LC–MS/MS) Identified Proteomic Biosignatures of Breast Cancer in Proximal Fluid. *J Proteome* 2012;
56. Kotai J. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Nor Inst Water Res.* 1972;11:5.
57. Campos A, Puerto M, Prieto A, Cameán A, Almeida AM, Coelho A V, Vasconcelos V. Protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis of proteins in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: an important tool for protein expression studies, food quality and safety assessment. *J Sci Food Agric.* 2013 May;93(7):1779–87.
58. Valério E, Vilares A, Campos A, Pereira P, Vasconcelos V. Effects of microcystin-LR on *Saccharomyces cerevisiae* growth, oxidative stress and apoptosis. *Toxicon.* 2014 Nov;90:191–8.
59. Neuhoﬀ V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie

- Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1988;9(6):255–62.
60. Wang Y-H, Li K-J, Mao L, Hu X, Zhao W-J, Hu A, Lian H-Z, Zheng W-J. Effects of Exogenous Zinc on Cell Cycle, Apoptosis and Viability of MDAMB231, HepG2 and 293 T Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Sep;154(3):418–26.
 61. Mozes E, Hunya A, Posa A, Penke B, Datki Z. A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays. *Brain Res Bull*. Elsevier Inc.; 2012 Apr 10;87(6):521–5.
 62. Lemarie a, Grimm S. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene*. 2011 Sep 22;30(38):3985–4003.
 63. Borbone E, Berlingieri MT, De Bellis F, Nebbioso a, Chiappetta G, Mai a, Altucci L, Fusco a. Histone deacetylase inhibitors induce thyroid cancer-specific apoptosis through proteasome-dependent inhibition of TRAIL degradation. *Oncogene*. 2010 Jan 7;29(1):105–16.
 64. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal*. 2011 Jun;5(2):101–10.
 65. Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2011 Jan;6(5):e20151.
 66. Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Salem AF, Tsigirgos A, Lamb R, Sneddon S, Hult J, Howell A, Lisanti MP. Mitochondria “fuel” breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle*. 2012 Dec 1;11(23):4390–401.
 67. Freeman A, Morrison D. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(7):681–7.
 68. Rufino-Palomares EE, Reyes-Zurita FJ, García-Salguero L, Mokhtari K, Medina PP, Lupiáñez J a, Peragón J. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. *J Proteomics*. Elsevier B.V.; 2013 May 27;83:15–25.
 69. Chan SW, Lim CJ, Chen L, Chong YF, Huang C, Song H, Hong W. The Hippo pathway in biological control and cancer development. *J Cell Physiol*. 2011 Apr;226(4):928–39.

70. Sluchanko NN, Gusev NB. 14-3-3 Proteins and regulation of cytoskeleton. *Biochem.* 2011 Jan 14;75(13):1528–46.
71. Zhou Q, Snider NT, Liao J, Li DH, Hong A, Ku N-O, Cartwright C a, Omary MB. Characterization of in vivo keratin 19 phosphorylation on tyrosine-391. *PLoS One.* 2010 Jan;5(10):e13538.
72. Wu Z, Fu C, Shi L, Ruan L, Lin D, Guo C. Structural basis for RKIP binding with its substrate Raf1 kinase. *Biotechnol Lett.* 2014 Sep;36(9):1869–74.
73. Barnes E a, Kenerson HL, Mak BC, Yeung RS. The loss of tuberlin promotes cell invasion through the β -catenin pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Nov;43(5):617–27.
74. Spilka R, Ernst C, Mehta AK, Haybaeck J. Eukaryotic translation initiation factors in cancer development and progression. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2013 Oct 28;340(1):9–21.
75. Wang C, Guo K, Gao D, Kang X, Jiang K, Li Y, Sun L, Zhang S, Sun C, Liu X, Wu W, Yang P, Liu Y. Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples. *Cancer Lett. Elsevier Ireland Ltd;* 2011 Dec 27;313(2):154–66.
76. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis. Nature Publishing Group;* 2013 Jan;4(3):e532.
77. Wang H-Q, Du Z-X, Liu B-Q, Gao Y-Y, Meng X, Guan Y, Zhang H-Y. TNF-related apoptosis-inducing ligand suppresses PRDX4 expression. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies;* 2009 May 6;583(9):1511–5.
78. Pegg AE. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol.* 2013 Dec 16;26(12):1782–800.
79. Xu Y, Johansson M, Karlsson A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem.* 2008 Jan 18;283(3):1563–71.
80. Amiri M, Conserva F, Panayiotou C, Karlsson A, Solaroli N. The human adenylate kinase 9 is a nucleoside mono- and diphosphate kinase. *Int J Biochem Cell Biol. Elsevier Ltd;* 2013 May;45(5):925–31.
81. Pace NJ, Pimental DR, Weerapana E. An inhibitor of glutathione S-transferase omega 1 that selectively targets apoptotic cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2012 Aug 13;51(33):8365–8.

82. Chuang J-J, Dai Y-C, Lin Y-L, Chen Y-Y, Lin W-H, Chan H-L, Liu Y-W. Downregulation of glutathione S-transferase M1 protein in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced mouse bladder carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* Elsevier Inc.; 2014 Sep 15;279(3):322–30.
83. Ko C-C, Chen Y-J, Chen C-T, Liu Y-C, Cheng F-C, Hsu K-C, Chow L-P. Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells. *J Biol Chem.* 2014 Aug 8;289(32):22078–89.
84. Oh HK, Lee E, Jang HN, Lee J, Moon H, Sheng Z, Jun Y, Loh TJ, Cho S, Zhou J, Green MR, Zheng X, Shen H. hnRNP A1 contacts exon 5 to promote exon 6 inclusion of apoptotic Fas gene. *Apoptosis.* 2013 Jul;18(7):825–35.
85. Zhang Y, Li Y, Lin C, Ding J, Liao G, Tang B. Aberrant Upregulation of 14-3-3 σ and EZH2 Expression Serves as an Inferior Prognostic Biomarker for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2014 Jan;9(9):e107251.
86. Xiang J, Xia X, Jiang Y, Leung AW, Wang X, Xu J, Wang P, Yu H, Bai D, Xu C. Apoptosis of ovarian cancer cells induced by methylene blue-mediated sonodynamic action. *Ultrasonics.* Elsevier B.V.; 2011 Apr;51(3):390–5.
87. Horn A, Fernandes C, Parrilha GL, Kanashiro MM, Borges F V, de Melo EJT, Schenk G, Terenzi H, Pich CT. Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. *J Inorg Biochem.* Elsevier Inc.; 2013 Jul 19;128C:38–47.

ANEXOS

ANEXO I

Gel Idx/Pos	5/A5	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFS3 PE=1	NDUS3_HUMAN	60	97.821	6	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1295.6631	1295.6683	0.0052	4	201	211 DFPLSGYVELR					Mascot
1295.6631	1295.6683	0.0052	4	201	211 DFPLSGYVELR					Mascot
1486.79	1486.8069	0.0169	11	219	231 VVAEPVELAQEFR	6	0			Mascot
1486.79	1486.8069	0.0169	11	219	231 VVAEPVELAQEFR					Mascot
1512.7877	1512.7932	0.0055	4	37	50 ESAGADTRPTVRPR					Mascot
1551.759	1551.7803	0.0213	14	187	199 ILTDYGFEGHPFR					Mascot
1614.885	1614.9042	0.0192	12	219	232 VVAEPVELAQEFRK					Mascot
1679.854	1679.8596	0.0056	3	187	200 ILTDYGFEGHPFRK					Mascot

2	Zinc finger protein 177 OS=Homo sapiens GN=ZNF177 ZN177_HUMAN	26	0
	PE=2 SV=4		

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1179.6117	1179.5868	-0.0249	-21	183	192 KAFNQESSLR					Mascot
1179.6117	1179.5868	-0.0249	-21	184	193 AFNQESSLRK					Mascot
1493.7417	1493.7573	0.0156	10	264	276 TFTPDLSQLNCVR					Mascot
1551.839	1551.7803	-0.0587	-38	441	453 VHVRTHTGKPYK					Mascot
1851.8477	1851.856	0.0083	4	332	347 RHTHTGKPYDCKEKGK					Mascot

Gel Idx/Pos	6/A6	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein NDUS3_HUMAN 79 99.977 22 87.577
3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFS3 PE=1

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1295.6631	1295.6726	0.0095	7	201	211 DFPLSGYVELR				Mascot
1295.6631	1295.6726	0.0095	7	201	211 DFPLSGYVELR				Mascot
1385.7635	1385.7579	-0.0056	-4	110	122 SLVDLTAVDVPTK				Mascot
1486.79	1486.8121	0.0221	15	219	231 VVAEPVELAQEFR	22	87.577		Mascot
1486.79	1486.8121	0.0221	15	219	231 VVAEPVELAQEFR				Mascot
1551.759	1551.7914	0.0324	21	187	199 ILTDYGFEGHPFR				Mascot
1614.885	1614.8973	0.0123	8	219	232 VVAEPVELAQEFR				Mascot
1679.854	1679.8839	0.0299	18	187	200 ILTDYGFEGHPFR				Mascot
1740.838	1740.8623	0.0243	14	233	246 FDLNSPWEAFVYR				Mascot
1868.933	1868.9329	-0.0001	0	232	246 KFDLNSPWEAFVYR				Mascot
1899.9586	1899.9354	-0.0232	-12	145	161 TYTDLTPIESAVSVFK				Mascot

2 AN1-type zinc finger protein 3 OS=Homo sapiens ZFAN3_HUMAN 28 0
GN=ZFAND3 PE=1 SV=1

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1013.4655	1013.4497	-0.0158	-16	156	163 RCFQCQTK				Mascot
1037.468	1037.4623	-0.0057	-5	1	10 MGDAGSERSK				Mascot
1039.4296	1039.4631	0.0335	32	218	227 SCQRIGEGCS				Mascot
1179.5964	1179.6	0.0036	3	143	152 SEETSRSKQK				Mascot
2584.229	2584.2666	0.0376	15	164	185 LELVQQLGSCRCGYVF CMLHR				Mascot

Gel Idx/Pos	11/A11	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Spermidine synthase OS=Homo sapiens GN=SRM PE=1 SV=1	SPEE_HUMAN	73	99.905	19	81.833

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1053.5728	1053.5891	0.0163	15	48	55 YQDILVFR					Mascot
1120.615	1120.6385	0.0235	21	286	295 AAFVLPEFAR	19	81.833			Mascot
1120.615	1120.6385	0.0235	21	286	295 AAFVLPEFAR					Mascot
1225.7262	1225.736	0.0098	8	97	109 VLIIGGGDGGVLR					Mascot
1296.7059	1296.7163	0.0104	8	46	55 SRYQDILVFR					Mascot
1296.7059	1296.7163	0.0104	8	46	55 SRYQDILVFR					Mascot
1353.8212	1353.8331	0.0119	9	96	109 KVLIIIGGGDGGVLR					Mascot
1353.8212	1353.8331	0.0119	9	96	109 KVLIIIGGGDGGVLR					Mascot
1357.682	1357.6902	0.0082	6	136	148 FLPGMAIGYSSK					Mascot
1493.7457	1493.7449	-0.0008	-1	149	161 LTLHVGDFEFMK					Mascot
2754.3879	2754.3821	-0.0058	-2	254	277 NPSTNFOEPVQPLTQQQ VAQMQLK					Mascot

2	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	K1C10_HUMAN	44	13.251
---	--	-------------	----	--------

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1234.679	1234.6831	0.0041	3	236	245 LKYENEVALR					Mascot
1357.7183	1357.6902	-0.0281	-21	246	257 QSVEADINGLRR					Mascot
1365.6393	1365.6577	0.0184	13	323	333 SQYEQLAEQNR					Mascot
1434.7699	1434.7697	-0.0002	0	440	450 IRLNEIQTYR					Mascot
1493.7343	1493.7449	0.0106	7	323	334 SQYEQLAEQNRK					Mascot
1651.8214	1651.7723	-0.0491	-30	195	207 DYSKYYKTIDDLK					Mascot
1707.7721	1707.7943	0.0222	13	41	59 GSLGGGFSSGFGSGGSF SR					Mascot
1994.9308	1994.9492	0.0184	9	16	40 SGGGGGGGGCGGGGG VSSLRISSSK					Mascot
2981.5081	2981.5134	0.0073	2	346	370 ELTTEIDNNIEQISSYKSEI TELRR					Mascot

Gel Idx/Pos	12/A12	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]/22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Spermidine synthase OS=Homo sapiens GN=SRM PE=1 SV=1	SPEE_HUMAN	82	99.987	18	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1053.5728	1053.5923	0.0195	19	48	55 YQDILVFR				Mascot
1120.615	1120.6349	0.0199	18	286	295 AAFVLPEFAR	18	0		Mascot
1120.615	1120.6349	0.0199	18	286	295 AAFVLPEFAR				Mascot
1225.7262	1225.7323	0.0061	5	97	109 VLIIGGGDGGVLR				Mascot
1296.7059	1296.717	0.0111	9	46	55 SRYQDILVFR				Mascot
1296.7059	1296.717	0.0111	9	46	55 SRYQDILVFR				Mascot
1353.8212	1353.8409	0.0197	15	96	109 KVLIIIGGGDGGVLR				Mascot
1493.7457	1493.7466	0.0009	1	149	161 LTLHVGDFEFMK				Mascot

2	Zinc finger protein 823 OS=Homo sapiens GN=ZNF823 ZN823_HUMAN	32	0
	PE=2 SV=2		

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1493.8005	1493.7466	-0.0539	-36	420	433 QCGKAFLAGSLRR				Mascot
1509.7842	1509.7242	-0.06	-40	27	38 SLYRNVMQETIR				Mascot
1638.854	1638.8619	0.0079	5	200	212 AFWWPSLFLHER				Mascot
1707.7955	1707.8081	0.0126	7	181	195 RHMAAHHGDPYKCK				Mascot
1936.929	1936.9816	0.0526	27	31	46 NVMQETIRNLDCIEMK				Mascot

Gel Idx/Pos	21/A21	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_HUMAN	99	100	54	99.994

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1047.3944	1047.4238	0.0294	28	19	27 YDDMAACMK				Mascot
1279.6528	1279.6328	-0.02	-16	128	139 YLAEVAAGDDKK				Mascot
1304.6844	1304.6646	-0.0198	-15	104	115 FLIPNASQAESK	5	0		Mascot
1304.6844	1304.6646	-0.0198	-15	104	115 FLIPNASQAESK				Mascot
1548.7136	1548.7136	0	0	28	41 SVTEQGAELSNEER	17	67.461		Mascot
1548.7136	1548.7136	0	0	28	41 SVTEQGAELSNEER				Mascot
2040.9873	2040.9789	-0.0084	-4	140	157 GIVDQSQAQYQEAFEISK				Mascot
2169.0823	2169.0793	-0.003	-1	140	158 GIVDQSQAQYQEAFEISK K				Mascot
2437.2205	2437.2429	0.0224	9	28	49 SVTEQGAELSNEERNLLS VAYK	32	99.064		Mascot
2437.2205	2437.2429	0.0224	9	28	49 SVTEQGAELSNEERNLLS VAYK				Mascot
3301.6223	3301.6396	0.0173	5	128	157 YLAEVAAGDDKKGIVDQS QAQYQEAFEISK				Mascot

2	Zinc finger protein 64 homolog, isoforms 3 and 4 OS=Homo sapiens GN=ZFP64 PE=2 SV=3	ZF64B_HUMAN	23	0
---	---	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1034.4658	1034.4288	-0.037	-36	469	477 CLHCAFQGR				Mascot
1085.4016	1085.4381	0.0365	34	525	533 QDFCSFDTK				Mascot
1780.7782	1780.8174	0.0392	22	407	422 SHTGDTFPQCWLCSAK				Mascot
1851.8654	1851.847	-0.0184	-10	207	223 TCDYAAADSSSLNKHRL				Mascot
2169.1333	2169.0793	-0.054	-25	278	297 APVITLPSEAREQMATLG ER				Mascot
2501.2551	2501.2681	0.013	5	265	288 ANCLSTESTDTPKAPVITL PSEAR				Mascot
3301.6316	3301.6396	0.008	2	379	406 IHSDEPYPKQQLCPYASR NSSQLTVHLR				Mascot

Gel Idx/Pos	22/A22	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_HUMAN	171	100	118	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1304.6844	1304.6598	-0.0246	-19	104	115 FLIPNASQAESK	33	97.809		Mascot
1304.6844	1304.6598	-0.0246	-19	104	115 FLIPNASQAESK				Mascot
1548.7136	1548.7216	0.008	5	28	41 SVTEQGAELSNEER				Mascot
2040.9873	2040.9813	-0.006	-3	140	157 GIVDQSQAAYQEAFAISK	68	100		Mascot
2040.9873	2040.9813	-0.006	-3	140	157 GIVDQSQAAYQEAFAISK				Mascot
2169.0823	2169.0781	-0.0042	-2	140	158 GIVDQSQAAYQEAFAISK K				Mascot
2437.2205	2437.2344	0.0139	6	28	49 SVTEQGAELSNEERNLLS VAYK	17	29.424		Mascot
2437.2205	2437.2344	0.0139	6	28	49 SVTEQGAELSNEERNLLS VAYK				Mascot
3302.6348	3302.6921	0.0573	17	194	222 TAFDEAIAELDTLSEESYK DSTLIIMQLLR				Mascot

2	Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2	PROF1_HUMAN	28	0
---	--	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1109.4867	1109.4526	-0.0341	-31	128	136 CYEMASHLR				Mascot
1854.8903	1854.8544	-0.0359	-19	76	91 DSLLQDGEFSMDLR TK				Mascot
2300.1816	2300.1443	-0.0373	-16	55	75 DRSSFYVNGLTGGQK C SVIR				Mascot

Gel Idx/Pos	23/A23	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	1433E_HUMAN	310	100	183	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1189.6609	1189.6589	-0.002	-2	216	225 DSTLMQLLR					Mascot
1194.6001	1194.585	-0.0151	-13	143	153 EAAENSLVAYK					Mascot
1256.5906	1256.6074	0.0168	13	131	141 YLAEFATGNDR	80	100			Mascot
1256.5906	1256.6074	0.0168	13	131	141 YLAEFATGNDR					Mascot
1351.6488	1351.6526	0.0038	3	2	12 DDREDLVYQAK					Mascot
1384.6855	1384.7015	0.016	12	131	142 YLAEFATGNDRK	44	99.931			Mascot
1384.6855	1384.7015	0.016	12	131	142 YLAEFATGNDRK					Mascot
1417.7533	1417.7118	-0.0415	-29	62	73 IISIEQKEENK					Mascot
1447.7097	1447.7188	0.0091	6	30	42 VAGMDVELTVEER	59	99.998			Mascot
1447.7097	1447.7188	0.0091	6	30	42 VAGMDVELTVEER					Mascot
1575.8047	1575.8148	0.0101	6	29	42 KVAGMDVELTVEER					Mascot
1819.9371	1819.9498	0.0127	7	154	170 AASDIAMTELPPTHPIR					Mascot
1903.9607	1903.9413	-0.0194	-10	62	78 IISIEQKEENKGGEDK					Mascot
1928.8728	1928.8882	0.0154	8	13	28 LAEQAERYDEM/ESMK					Mascot
2056.9678	2056.9861	0.0183	9	13	29 LAEQAERYDEM/ESMKK					Mascot
2087.9656	2087.9641	-0.0015	-1	197	215 AAFDDAIAELDTLSEESY K					Mascot
2560.2678	2560.2966	0.0288	11	131	153 YLAEFATGNDRKEAEN SLVAYK					Mascot
3258.6086	3258.6733	0.0647	20	197	225 AAFDDAIAELDTLSEESY KDSTLMQLLR					Mascot
3451.4714	3451.5166	0.0452	13	226	255 DNLTLTWSDMQGDGEE QNKEALQDVEDENQ					Mascot

2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 OS=Homo sapiens GN=NDUFA12 PE=1 SV=1	NDUAC_HUMAN	39	0
---	--	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1073.5891	1073.5514	-0.0377	-35	107	114 KFIWTHNHK					Mascot

Gel Idx/Pos	24/A24	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	1433E_HUMAN	240	100	136	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1189.6609	1189.6639	0.003	3	216	225 DSTLMQLLR				Mascot
1194.6001	1194.5833	-0.0168	-14	143	153 EAAENSLVAYK				Mascot
1256.5906	1256.6116	0.021	17	131	141 YLAEFATGNDR	53	99.988		Mascot
1256.5906	1256.6116	0.021	17	131	141 YLAEFATGNDR				Mascot
1351.6488	1351.6484	-0.0004	0	2	12 DDREDLVYQAK				Mascot
1384.6855	1384.7042	0.0187	14	131	142 YLAEFATGNDRK	37	99.614		Mascot
1384.6855	1384.7042	0.0187	14	131	142 YLAEFATGNDRK				Mascot
1447.7097	1447.7194	0.0097	7	30	42 VAGMDVELTVEER	46	99.948		Mascot
1447.7097	1447.7194	0.0097	7	30	42 VAGMDVELTVEER				Mascot
1575.8047	1575.8103	0.0056	4	29	42 KVAGMDVELTVEER				Mascot
1819.9371	1819.9523	0.0152	8	154	170 AASDIAMTELPPTHPIR				Mascot
1928.8728	1928.8865	0.0137	7	13	28 LAEQAERYDEMVESMK				Mascot
2056.9678	2056.9893	0.0215	10	13	29 LAEQAERYDEMVESMKK				Mascot
2087.9656	2087.9675	0.0019	1	197	215 AAFDDAIAELDTLSEESY K				Mascot
2560.2678	2560.2898	0.022	9	131	153 YLAEFATGNDRKEAEN SLVAYK				Mascot
3451.4714	3451.5513	0.0799	23	226	255 DNLTLTWTSMDQGDGEE QNKEALQDVEDENQ				Mascot

2	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLUD2 PE=1 SV=2	DHE4_HUMAN	40	0
---	---	------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1000.4556	1000.4318	-0.0238	-24	69	76 MVEGFFDR				Mascot
1089.5323	1089.5277	-0.0046	-4	52	60 HYSVLVADR				Mascot
1447.7467	1447.7194	-0.0273	-19	546	558 VFKVYSEAGVTFT				Mascot
1447.7467	1447.7194	-0.0273	-19	546	558 VFKVYSEAGVTFT				Mascot

Gel Idx/Pos	28/B1	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1 Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens
GN=KRT19 PE=1 SV=4 K1C19_HUMAN 80 99.979

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1008.5261	1008.493	-0.0331	-33	112	118 IRDWYQK				Mascot
1082.4901	1082.4886	-0.0015	-1	266	274 DAEAWFTSR				Mascot
1222.6427	1222.6304	-0.0123	-10	167	176 TKFETEQLR				Mascot
1365.7122	1365.7113	-0.0009	-1	371	381 SRLEQEIATYR				Mascot
1365.7122	1365.7113	-0.0009	-1	371	381 SRLEQEIATYR				Mascot
1554.7506	1554.7483	-0.0023	-1	8	24 QSSATSSFGLGGGSVR				Mascot
1554.7506	1554.7483	-0.0023	-1	8	24 QSSATSSFGLGGGSVR				Mascot
1674.7759	1674.7731	-0.0028	-2	126	138 DYSHYTTIQDLR				Mascot
1826.9408	1826.9337	-0.0071	-4	25	43 FGPGVAFRAPSIHGGSG GR				Mascot
1904.8984	1904.8838	-0.0146	-8	382	398 SLLEGQEDHYNNLSASK				Mascot
2228.0725	2228.0886	0.0161	7	275	293 TEELNREVAHGTEQLQM SR				Mascot
2808.332	2808.3164	-0.0156	-6	52	81 FVSSSSSGAYGGGYGGV LTASDGLLAGNEK				Mascot
3222.5872	3222.6528	0.0656	20	217	247 NHEEEISTLRGQVGGQV SVEVDSAPGTDIAK				Mascot

2 N-alpha-acetyltransferase 30 OS=Homo sapiens
GN=NAA30 PE=1 SV=1 NAA30_HUMAN 29 0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1365.7042	1365.7113	0.0071	5	186	198 LLSSSLTADCSLR				Mascot
1365.7042	1365.7113	0.0071	5	186	198 LLSSSLTADCSLR				Mascot
1752.9642	1752.8948	-0.0694	-40	328	342 SALKLYENLGFVRDK				Mascot
2284.2144	2284.1814	-0.033	-14	105	128 VLSVAEVAATTATPDGGP RATATK				Mascot
2300.1526	2300.1416	-0.011	-5	212	229 TIRYVRYESELQMPDIMR				Mascot
3222.7163	3222.6528	-0.0635	-20	74	102 CPQPPQEQQQLNGLISP ELRHLRAAASLK				Mascot

Gel Idx/Pos	29/B2	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=4	K1C19_HUMAN	128	100	16	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1008.5261	1008.5048	-0.0213	-21	112	118 IRDWYQK				Mascot
1082.4901	1082.4862	-0.0039	-4	266	274 DAEAWFTSR				Mascot
1222.6427	1222.6239	-0.0188	-15	167	176 TKFETEQLR				Mascot
1365.7122	1365.7092	-0.003	-2	371	381 SRLEQEIATYR				Mascot
1365.7122	1365.7092	-0.003	-2	371	381 SRLEQEIATYR				Mascot
1554.7506	1554.7504	-0.0002	0	8	24 QSSATSSFGLGGGSVR	16	0		Mascot
1554.7506	1554.7504	-0.0002	0	8	24 QSSATSSFGLGGGSVR				Mascot
1826.9408	1826.9126	-0.0282	-15	25	43 FGPGVAFRAPSIIHGGSG GR				Mascot
1904.8984	1904.88	-0.0184	-10	382	398 SLLEGQEDHYNNLSASK				Mascot
2228.0725	2228.0732	0.0007	0	275	293 TEELNREVAGHTEQLQMSR				Mascot
2808.332	2808.3525	0.0205	7	52	81 FVSSSSGAYGGGYGGVLTASDGLLAGNEK				Mascot
3222.5872	3222.5842	-0.003	-1	217	247 NHEEEISTLRGQVGGQVSVEVDSAPGTDLAK				Mascot

2	Calmodulin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=CALML3 PE=1 SV=2	CALL3_HUMAN	30	0
---	---	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1537.738	1537.7267	-0.0113	-7	2	14 ADQLTEEQVTEFK				Mascot
1537.738	1537.7267	-0.0113	-7	2	14 ADQLTEEQVTEFK				Mascot
2228.1094	2228.0732	-0.0362	-16	88	107 EAFRVFDKDGNGFVSAEELR				Mascot
2244.061	2244.05	-0.011	-5	59	78 DGNGTVDVPEFLGMMARKMK				Mascot

Gel Idx/Pos	34/B7	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]/22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1	PRDX4_HUMAN	103	100	68	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1212.626	1212.6127	-0.0133	-11	231	240 LVQAFQYTDK				Mascot
1225.6899	1225.6871	-0.0028	-2	213	223 QITLNDLPVGR	31	98.815		Mascot
1225.6899	1225.6871	-0.0028	-2	213	223 QITLNDLPVGR				Mascot
1359.7994	1359.8054	0.006	4	201	212 GLFIIDDKGILR	37	99.708		Mascot
1359.7994	1359.8054	0.006	4	201	212 GLFIIDDKGILR				Mascot
1624.7601	1624.7621	0.002	1	187	200 DYGVYLEDGHTLR				Mascot
2108.0688	2108.0559	-0.0139	-7	81	99 ISKPAPYWEGTAVIDGEF K				Mascot
2478.2915	2478.2917	0.0002	0	81	102 ISKPAPYWEGTAVIDGEF KELK				Mascot

2	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	45	39.984	37	99.708
---	--	-------------	----	--------	----	--------

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1211.6743	1211.6537	-0.0206	-17	141	151 QITVNDLPVGR				Mascot
1359.7994	1359.8054	0.006	4	129	140 GLFIIDDKGILR	37	99.708		Mascot
1359.7994	1359.8054	0.006	4	129	140 GLFIIDDKGILR				Mascot

Gel Idx/Pos	35/B8	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1	PRDX4_HUMAN	85	99.993	32	98.13

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1212.626	1212.5836	-0.0324	-27	231	240 LVQAFQYTDK				Mascot
1225.6899	1225.6835	0.0036	3	213	223 QITLNDLPVGR				Mascot
1359.7994	1359.8096	0.0102	8	201	212 GLFIIDDKGILR	32	98.13		Mascot
1359.7994	1359.8096	0.0102	8	201	212 GLFIIDDKGILR				Mascot
1624.7601	1624.7708	0.0107	7	187	200 DYGVYLEDSGHTLR				Mascot
2108.0698	2108.0542	-0.0156	-7	81	99 ISKPAPYWEGTAVIDGEF K				Mascot
2478.2915	2478.2571	-0.0344	-14	81	102 ISKPAPYWEGTAVIDGEF KELK				Mascot

2	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	38	0	32	98.13
---	--	-------------	----	---	----	-------

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1359.7994	1359.8096	0.0102	8	129	140 GLFIIDDKGILR	32	98.13		Mascot
1359.7994	1359.8096	0.0102	8	129	140 GLFIIDDKGILR				Mascot

Gel Idx/Pos	36/B9	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2	TALDO_HUMAN	153	100	88	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1119.6157	1119.6089	-0.0068	-6	315	324 FAADAVKLER					Mascot
1213.6787	1213.6632	-0.0155	-13	259	269 LLGELLQDNAK	61	99.998			Mascot
1213.6787	1213.6632	-0.0155	-13	259	269 LLGELLQDNAK					Mascot
1233.5997	1233.5885	-0.0112	-9	205	215 SYEPLEDPGVK					Mascot
1247.7106	1247.6932	-0.0174	-14	314	324 KFAADAVKLER					Mascot
1252.6355	1252.6345	-0.001	-1	111	121 LSFQKAMVAR	27	95.824			Mascot
1252.6355	1252.6345	-0.001	-1	111	121 LSFQKAMVAR					Mascot
1276.6532	1276.6302	-0.023	-18	143	154 LSSTWEGIQAGK					Mascot
1439.7642	1439.7593	-0.0049	-3	193	204 ILDWHVANTDKK					Mascot
1499.6947	1499.6813	-0.0134	-9	296	307 WLHNEDQMAVEK					Mascot
1519.8843	1519.8446	-0.0397	-26	124	136 RLIELYKEAGISK					Mascot
1634.9111	1634.9147	0.0036	2	125	138 LIELYKEAGISKDR					Mascot
1667.8599	1667.8424	-0.0175	-10	278	282 AAQASDLEKIHLDEK					Mascot

2	RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1	EWS_HUMAN	50	80.127
---	--	-----------	----	--------

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1039.4738	1039.4749	0.0011	1	305	314 GGFDKRGMSR					Mascot
1048.5105	1048.4789	-0.0316	-30	582	592 GGPGMFRGGR					Mascot
1076.4901	1076.5096	0.0195	18	293	302 SMSGPDNRGR					Mascot
1119.5654	1119.6089	0.0435	39	649	656 QERRDRPY					Mascot
1179.5613	1179.5823	0.021	18	507	518 GNPSGGGNVQHR					Mascot
1252.5963	1252.6345	0.0382	30	303	314 GRGGFDKRGMSR					Mascot
1252.5963	1252.6345	0.0382	30	303	314 GRGGFDKRGMSR					Mascot
1268.6165	1268.6205	0.004	3	637	648 GGPGKMDKGEHR					Mascot

Gel Idx/Pos	37/B10	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Transaldolase OS=Homo sapiens GN=TALDO1 PE=1 SV=2	TALDO_HUMAN	105	100	38	99.324

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1119.6157	1119.5945	-0.0212	-19	315	324	FAADAVKLER				Mascot
1213.6787	1213.6638	-0.0149	-12	259	269	LLGELLQDNAK	38	99.324		Mascot
1213.6787	1213.6638	-0.0149	-12	259	269	LLGELLQDNAK				Mascot
1233.5997	1233.5875	-0.0122	-10	205	215	SYEPLEDPGVK				Mascot
1252.6355	1252.6344	-0.0011	-1	111	121	LSFDKAMVAR				Mascot
1252.6355	1252.6344	-0.0011	-1	111	121	LSFDKAMVAR				Mascot
1276.6532	1276.6335	-0.0197	-15	143	154	LSSTWEGIQAGK				Mascot
1439.7642	1439.7665	0.0023	2	193	204	ILDVHVANTDKK				Mascot
1499.6947	1499.6855	-0.0092	-6	286	307	WLHNEDQMAVEK				Mascot
1519.8843	1519.8291	-0.0552	-36	124	136	RLIELYKEAGISK				Mascot
1634.9111	1634.9226	0.0115	7	125	138	LIELYKEAGISKDR				Mascot

2	Kinesin-like protein KIF11 OS=Homo sapiens GN=KIF11 PE=1 SV=2	KIF11_HUMAN	33	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1119.6117	1119.5945	-0.0172	-15	54	64	TGGLADKSSRK				Mascot
1213.6324	1213.6638	0.0314	26	306	315	TPHVPYRESK				Mascot
1213.6324	1213.6638	0.0314	26	306	315	TPHVPYRESK				Mascot
1233.6208	1233.5875	-0.0333	-27	247	257	ETTDGEELVK				Mascot
1276.6678	1276.6335	-0.0343	-27	1	12	MASQPNSSAKKK				Mascot
1309.6635	1309.6252	-0.0383	-29	377	386	EYTEEIERLK				Mascot
1444.7502	1444.7275	-0.0227	-16	1021	1032	DKENRGINTLER				Mascot
1634.8973	1634.9226	0.0253	15	941	953	TEPREHLLDQLKR				Mascot
1763.8125	1763.827	0.0145	8	955	969	QPELLMMLNCSNNK				Mascot
2042.1439	2042.0731	-0.0708	-35	18	34	NIQVVVRCRPFNLAERK				Mascot

Gel Idx/Pos	38/B11	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]/22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1 SV=4	PSB4_HUMAN	56	94.269	14	6.29

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1036.5674	1036.5582	-0.0082	-9	232	240 FQIATVTEK					Mascot
1128.6008	1128.6086	0.0078	7	202	211 QPVLSTQTEAR					Mascot
1556.8068	1556.8398	0.033	21	228	240 SYNRFQIATVTEK					Mascot
1726.9333	1726.9631	0.0298	17	197	211 EVLEKQPVLSTQTEAR	14	6.29			Mascot
1726.9333	1726.9631	0.0298	17	197	211 EVLEKQPVLSTQTEAR					Mascot
1867.8895	1867.8806	-0.0089	-5	24	40 IPSTPDSFMDPASALYR					Mascot
2443.1921	2443.2456	0.0535	22	110	131 QVLGQMWIDEELLGDGH SYSPR					Mascot

2	Keratin-81-like protein KRT121P OS=Homo sapiens GN=KRT121P PE=5 SV=4	K121P_HUMAN	40	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1011.453	1011.4277	-0.0253	-25	123	130 AEAESWYR					Mascot
1016.5007	1016.513	0.0123	12	152	159 EEINELNR					Mascot
1179.5861	1179.6102	0.0241	20	133	142 CEEMKATVIR					Mascot
1544.7849	1544.8038	0.0189	12	152	163 EEINELNRMQIR					Mascot
1867.9371	1867.8806	-0.0565	-30	220	234 EYQEV/MNSKLAWTLR					Mascot
2443.2212	2443.2456	0.0244	10	2	23 EANSGRSLASELNHVQEV LEGYK					Mascot
2500.2825	2500.2883	0.0058	2	152	172 EEINELNRMQRLTAEEV NAK					Mascot

Gel Idx/Pos	39/B12	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Proteasome subunit beta type-4 OS=Homo sapiens GN=PSMB4 PE=1 SV=4	PSB4_HUMAN	96	100	54	99.987

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1128.6008	1128.6053	0.0045	4	202	211 QPVLSQTEAR				Mascot
1556.8068	1556.818	0.0112	7	228	240 SYNRFQIATVTEK				Mascot
1726.9333	1726.9648	0.0315	18	197	211 EVLEKQPVLSQTEAR	54	99.987		Mascot
1726.9333	1726.9648	0.0315	18	197	211 EVLEKQPVLSQTEAR				Mascot
1867.8895	1867.8733	-0.0162	-9	24	40 IPSTPDSFMDPASALYR				Mascot
2443.1921	2443.2305	0.0384	16	110	131 QVLGQMVIDEELLGDGH SYSPR				Mascot

2	Homeodomain-only protein OS=Homo sapiens GN=HOPX PE=1 SV=1	HOP_HUMAN	36	0		
---	---	-----------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1475.7172	1475.7737	0.0565	38	58	69 WRRSEQLPSECR				Mascot
2442.1306	2442.1965	0.0659	27	2	23 SAETASGPTEDQVEILEY NPNK				Mascot
2443.1658	2443.2305	0.0647	26	27	49 HPDSTTLCLIAAEAGLSE EETQK				Mascot

Gel Idx/Pos	40/B13	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SRSF1 PE=1 SV=2	SRSF1_HUMAN	57	95.848	25	92.058

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1078.5527	1078.5383	-0.0144	-13	155	164 DGTGVVEFVR				Mascot
1078.5527	1078.5383	-0.0144	-13	155	164 DGTGVVEFVR				Mascot
1123.4327	1123.4343	0.0016	1	75	83 DGYDYDGYR				Mascot
1162.5487	1162.5358	-0.0129	-11	182	191 SHEGETAYIR				Mascot
1163.642	1163.6289	-0.0131	-11	39	48 YGAIRDILK	14	0		Mascot
1163.642	1163.6289	-0.0131	-11	39	48 YGAIRDILK				Mascot
1256.6997	1256.7032	0.0035	3	18	28 IYVGNLPPDIR	11	0		Mascot
1256.6997	1256.7032	0.0035	3	18	28 IYVGNLPPDIR				Mascot
1392.6179	1392.6089	-0.009	-6	75	85 DGYDYDGYRLR				Mascot
2541.168	2541.1711	0.0031	1	52	74 GGPPFAFVEFEDPRDAE DAVYGR				Mascot

2	Spermatogenesis-associated protein 8 OS=Homo sapiens GN=SPAT8 PE=1 SV=1	SPAT8_HUMAN	22	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1018.4006	1018.4158	0.0152	15	65	73 EENSCSHGR				Mascot
1798.8726	1798.8114	-0.0612	-34	65	79 EENSCSHGRIRVQR				Mascot
2541.1497	2541.1711	0.0214	8	2	25 APAGMSGAQDNSCLYQE IAPSFQR				Mascot

Gel Idx/Pos	41/B14	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Serine/arginine-rich splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SRSF1 PE=1 SV=2	SRSF1_HUMAN	45	32.661	5	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1163.642	1163.642	0	0	39	48 YGAIRDIDLK				Mascot
1163.642	1163.642	0	0	39	48 YGAIRDIDLK				Mascot
1256.6997	1256.7213	0.0216	17	18	28 IVVGNLPDIR	5	0		Mascot
1256.6997	1256.7213	0.0216	17	18	28 IVVGNLPDIR				Mascot
1392.6179	1392.632	0.0141	10	75	85 DGYDYDGYRLR				Mascot
2541.168	2541.1931	0.0251	10	52	74 GGPPFAFVEFEDPRDAE DAVYGR				Mascot

2	Membrane-associated progesterone receptor component 2 OS=Homo sapiens GN=PGRMC2 PE=1 SV=1	PGRMC2_HUMAN	34	0		
---	---	--------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1029.5	1029.5145	0.0145	14	192	199 EKYDVVGR				Mascot
1163.6167	1163.642	0.0253	22	101	109 RDFSLEQLR				Mascot
1163.6167	1163.642	0.0253	22	101	109 RDFSLEQLR				Mascot
1851.9381	1851.881	-0.0571	-31	150	166 DASRGLATFCLDKDALR				Mascot
1851.9381	1851.881	-0.0571	-31	150	166 DASRGLATFCLDKDALR				Mascot

Gel Idx/Pos	44/B17	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/ Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens GN=GSTO1 PE=1 SV=2	GSTO1_HUMAN	64	99.278	22	84.391

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1074.6306	1074.6287	-0.0019	-2	123	132 VPSLVGSFIR					Mascot
1089.5463	1089.5227	-0.0236	-22	102	110 LLPDDPYEK					Mascot
1095.5623	1095.5466	-0.0157	-14	58	65 NKPEWFFK					Mascot
1320.6907	1320.687	-0.0037	-3	12	25 GSAPPGPVPEGSIR	22	84.391			Mascot
1320.6907	1320.687	-0.0037	-3	12	25 GSAPPGPVPEGSIR					Mascot
1405.8274	1405.8221	-0.0053	-4	46	57 GIRHEVINILK					Mascot
1578.8738	1578.8251	-0.0487	-31	149	161 EFTKLEEVLTNKK					Mascot
1705.9231	1705.9158	-0.0073	-4	8	25 SLGKGSAPPGPVPEGSIR					Mascot

2	Zinc finger protein 548 OS=Homo sapiens GN=ZNF548 ZN548_HUMAN	30	0
	PE=2 SV=2		

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1016.4288	1016.3986	-0.0302	-30	395	403 CSECGKSFR					Mascot
1031.4285	1031.3916	-0.0369	-36	224	232 SYECLKCGK					Mascot
1576.7101	1576.7655	0.0554	35	205	217 TFTCSYSFVEHQK					Mascot
1765.7632	1765.8064	0.0432	24	470	484 IHSGERPYECSEQK					Mascot
1797.8232	1797.8071	-0.0161	-9	257	270 ECGKSFMYNYRLMR					Mascot
1810.7961	1810.8004	0.0043	2	146	160 VHMAEEFTCMEGWK					Mascot
1849.8431	1849.8152	-0.0279	-15	273	288 RVHTGERPYECNTCGK					Mascot
2300.0811	2300.1541	0.073	32	273	291 RVHTGERPYECNTCGKFR					Mascot

Gel Idx/Pos	45/B18	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Glutathione S-transferase omega-1 OS=Homo sapiens GN=GSTO1 PE=1 SV=2	GSTO1_HUMAN	22	0		

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1095.5623	1095.5321	-0.0302	-28	58	65 NKPEWFFK				Mascot
1095.5623	1095.5321	-0.0302	-28	58	65 NKPEWFFK				Mascot
1320.6907	1320.6962	0.0055	4	12	25 GSAPPGPVPEGSIR				Mascot
1320.6907	1320.6962	0.0055	4	12	25 GSAPPGPVPEGSIR				Mascot
1405.8274	1405.8335	0.0061	4	46	57 GIRHEVININLK				Mascot
2284.26	2284.1741	-0.0859	-38	49	66 HEVININLNKPEWFFKK				Mascot

2	Nuclear cap-binding protein subunit 2 OS=Homo sapiens GN=NCBP2 PE=1 SV=1	NCBP2_HUMAN	18	0		
---	--	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1320.6879	1320.6962	0.0083	6	124	135 QYGRGRSGGQVR				Mascot
1320.6879	1320.6962	0.0083	6	124	135 QYGRGRSGGQVR				Mascot
1849.8099	1849.8423	0.0324	18	136	151 DEYRQDYDAGRGGYGK				Mascot
1985.9675	1985.9658	-0.0017	-1	22	37 DQHFRGDNEEQEKLK				Mascot

Gel Idx/Pos	46/B19	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	28S ribosomal protein S22, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS22 PE=1 SV=1	RT22_HUMAN	20	0	6	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1283.7318	1283.7354	0.0036	3	281	291 IDGLLDQIQIR	6	0			Mascot
1283.7318	1283.7354	0.0036	3	281	291 IDGLLDQIQIR					Mascot
1390.6995	1390.7094	0.0099	7	105	116 LMTQAQLEEATR					Mascot
1411.8268	1411.8221	-0.0047	-3	280	291 KIDGLLDQIQIR					Mascot
1585.9312	1585.9353	0.0041	3	204	216 ILTPIIFKEENLR					Mascot
1714.0261	1714.0382	0.0121	7	203	216 KILTPIIFKEENLR					Mascot

2	LSM domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=LSMD1 PE=1 SV=1	LSMD1_HUMAN	19	0		
---	--	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1053.42	1053.4326	0.0126	12	12	20 EENGCCSRR					Mascot
1283.743	1283.7354	-0.0076	-6	41	51 ARQQLLEALLNK					Mascot
1283.743	1283.7354	-0.0076	-6	41	51 ARQQLLEALLNK					Mascot
1713.9792	1714.0382	0.059	34	43	56 QQLEALLNKTMRIR					Mascot

Gel Idx/Pos	47/B20	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1	28S ribosomal protein S22, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS22 PE=1 SV=1	RT22_HUMAN	49	74.981	11	0
---	--	------------	----	--------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1048.4807	1048.4504	-0.0303	-29	184	191 ASWEERDR					Mascot
1283.7318	1283.7382	0.0064	5	281	291 IDGLLDQIQIR	11	0			Mascot
1283.7318	1283.7382	0.0064	5	281	291 IDGLLDQIQIR					Mascot
1373.7899	1373.7853	-0.0046	-3	171	182 FIVVREPSGTLR					Mascot
1411.8268	1411.8356	0.0088	6	280	291 KIDGLLDQIQIR					Mascot
1411.8268	1411.8356	0.0088	6	280	291 KIDGLLDQIQIR					Mascot
1585.9312	1585.9536	0.0224	14	204	216 ILTPIIFKEENLR					Mascot
1714.0261	1714.0299	0.0038	2	203	216 KILTPIIFKEENLR					Mascot
2185.1599	2185.1594	-0.0005	0	136	155 VPINDVLAEDKILEGTETT K					Mascot
2513.2881	2513.3052	0.0171	7	334	355 TEAQKGAYIELTLQTYQE ALSR					Mascot

2	Zinc finger protein 62 homolog OS=Homo sapiens GN=ZFP62 PE=2 SV=3	ZFP62_HUMAN	25	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1004.4288	1004.4326	0.0038	4	420	428 AHECKECGK					Mascot
1016.4175	1016.4305	0.013	13	143	151 CDECGKSFK					Mascot
1031.4714	1031.4437	-0.0277	-27	30	38 VEDPMPESK					Mascot
1032.4601	1032.4407	-0.0194	-19	140	148 LHKDECGK					Mascot
1039.4513	1039.4458	-0.0055	-5	642	649 EKPVECDR					Mascot
1090.4946	1090.5044	0.0098	9	217	226 STHSGEKNCK					Mascot
1107.48	1107.5068	0.0268	24	83	92 TEQEGEASEK					Mascot
1109.4932	1109.4878	-0.0054	-5	39	48 VGDTCVWDSK					Mascot
1797.8734	1797.83	-0.0434	-24	842	857 CNECGKAFNIRSNLTK					Mascot
1854.8877	1854.8687	-0.019	-10	497	512 GIHLGEKPYKCSYCEK					Mascot
2513.2266	2513.3052	0.0786	31	861	883 THTGEESLNVIYVGSYSY					Mascot

Gel Idx/Pos	50/B23	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo ROA1_HUMAN 80 99.977
sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1049.4574	1049.4189	-0.0385	-37	123	130 DYFEQYQK				Mascot
1299.6539	1299.6373	-0.0166	-13	4	14 SESPKEPEQLR				Mascot
1299.6539	1299.6373	-0.0166	-13	4	14 SESPKEPEQLR				Mascot
1427.7489	1427.7408	-0.0081	-6	4	15 SESPKEPEQLRK				Mascot
1437.7445	1437.7368	-0.0077	-5	93	105 EDSQRPGAHLTVK				Mascot
1556.7386	1556.7909	0.0523	34	167	179 YHTVNGHNCEVRK				Mascot
1565.8395	1565.8304	-0.0091	-6	93	106 EDSQRPGAHLTVKK				Mascot
1628.7815	1628.7853	0.0038	2	337	352 SSGPYGGGGQYFAKPR				Mascot
1628.7815	1628.7853	0.0038	2	337	352 SSGPYGGGGQYFAKPR				Mascot
1694.7001	1694.6978	-0.0023	-1	353	370 NQGGYGGSSSSSYGS GR				Mascot
1784.9065	1784.9067	0.0002	0	16	31 LFIGGLSFETTDESLR				Mascot
1850.8011	1850.8478	0.0467	25	353	371 NQGGYGGSSSSSYGS GRR				Mascot
1879.9661	1879.9564	-0.0097	-5	107	122 IFVGGIKEDTEEHLR				Mascot
1913.0015	1912.9884	-0.0131	-7	15	31 KLFIGGLSFETTDESLR				Mascot
2249.0793	2249.0891	0.0098	4	123	140 DYFEQYQKIEVIMTDR				Mascot
2281.1499	2281.1289	-0.021	-9	147	166 GFAPVTFDDHDSVDKIVQK				Mascot

2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 RA1L2_HUMAN 32 0
OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1L2 PE=2 SV=2

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1049.4574	1049.4189	-0.0385	-37	123	130 DYFEQYQK				Mascot
1437.7445	1437.7368	-0.0077	-5	93	105 EDSQRPGAHLTVK				Mascot
1565.8395	1565.8304	-0.0091	-6	93	106 EDSQRPGAHLTVKK				Mascot
1784.9065	1784.9067	0.0002	0	16	31 LFIGGLSFETTDESLR				Mascot

Gel Idx/Pos	51/B24	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=5	ROA1_HUMAN	30	0	21	81.242

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1628.7815	1628.728	-0.0535	-33	337	352 SSGPYGGGGQYFAKPR	21	81.242		Mascot
1628.7815	1628.728	-0.0535	-33	337	352 SSGPYGGGGQYFAKPR				Mascot

2	Protein FAM47E OS=Homo sapiens GN=FAM47E PE=2 SV=3	FA47E_HUMAN	18	0		
---	--	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1628.7374	1628.728	-0.0094	-6	154	166 KLEDTWAYCQDTR				Mascot
1628.7374	1628.728	-0.0094	-6	155	167 LEDTWAYCQDTRK				Mascot

Gel Idx/Pos	52/C1	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6_HUMAN	135	100	86	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1085.599	1085.605	0.006	6	98	106 LPFPIIDDR	23	89.535		Mascot
1085.599	1085.605	0.006	6	98	106 LPFPIIDDR				Mascot
1135.651	1135.642	-0.009	-8	133	142 VVVFVGPDKK				Mascot
1191.6732	1191.6713	-0.0019	-2	145	155 LSILYPATTGR				Mascot
1355.743	1355.7358	-0.0072	-5	98	108 LPFPIIDDRNR				Mascot
1897.0066	1897	-0.0066	-3	68	84 LIALSIDSVEDHLAWSK				Mascot
2098.0928	2098.1169	0.0241	11	2	22 PGGLLLGDVAPNFEANTT VGR	63	100		Mascot
2098.0928	2098.1169	0.0241	11	2	22 PGGLLLGDVAPNFEANTT VGR				Mascot
2155.1428	2155.1348	-0.008	-4	107	125 NRELAILLGMLDPAEKDE K				Mascot

2	Keratin, type II cuticular Hb4 OS=Homo sapiens GN=KRT84 PE=2 SV=2	KRT84_HUMAN	27	0
---	---	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1001.472	1001.4558	-0.0162	-16	589	597 FVSTTTSCR				Mascot
1010.4611	1010.4429	-0.0182	-18	273	281 DVDAAFMNK				Mascot
1026.4561	1026.4591	0.003	3	253	260 YEEEVWCR				Mascot
1087.6106	1087.583	-0.0276	-25	167	175 EQIKTLNKK				Mascot
1138.5562	1138.5155	-0.0407	-36	272	281 KDVDAAFMNK				Mascot
1393.6781	1393.6602	-0.0179	-13	589	600 FVSTTTSCRTKY				Mascot
1896.9927	1897	0.0073	4	235	250 LQAERNHLQDVLEGFK				Mascot
2870.4539	2870.4827	0.0288	10	444	467 QLCEYQELMNAKGLDIE IATYRR				Mascot

Gel Idx/Pos	53/C2	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6_HUMAN	129	100	67	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1085.599	1085.616	0.017	16	98	106 LPFPIIDRR	10	0		Mascot
1085.599	1085.616	0.017	16	98	106 LPFPIIDRR				Mascot
1135.651	1135.6241	-0.0269	-24	133	142 VVVFVFGPKK				Mascot
1191.6732	1191.6654	-0.0078	-7	145	155 LSILYPATTGR				Mascot
1338.6359	1338.6525	0.0166	12	42	53 DFTPVCTTELGR				Mascot
1355.743	1355.7556	0.0126	9	98	108 LPFPIIDRRNR				Mascot
1897.0066	1896.9916	-0.015	-8	68	84 LIALSIDSVEDHLAWSK				Mascot
2098.0928	2098.1262	0.0334	16	2	22 PGGLLLGDVAPNFEANTT VGR	57	99.996		Mascot
2098.0928	2098.1262	0.0334	16	2	22 PGGLLLGDVAPNFEANTT VGR				Mascot
2155.1428	2155.1343	-0.0085	-4	107	125 NRELAILLGMLDPAEKDE K				Mascot

2	SAFB-like transcription modulator OS=Homo sapiens GN=SLTM PE=1 SV=2	SLTM_HUMAN	37	0
---	---	------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1005.4894	1005.457	-0.0324	-32	677	683 ERMERER				Mascot
1018.4911	1018.4536	-0.0375	-37	836	843 NELRESDR				Mascot
1021.4982	1021.4619	-0.0363	-36	305	313 DGKKEDCVK				Mascot
1025.4435	1025.4454	0.0019	2	755	763 FGHGSDYSR				Mascot
1032.5208	1032.4872	-0.0336	-33	141	149 ELLSAEENK				Mascot
1035.4854	1035.4716	-0.0138	-13	811	818 REDPSFER				Mascot
1051.4651	1051.4733	0.0082	8	472	480 ENDEKSSSR				Mascot
1085.5851	1085.616	0.0309	28	617	624 EHLVRFER				Mascot
1085.5851	1085.616	0.0309	28	617	624 EHLVRFER				Mascot
1851.9447	1851.8804	-0.0643	-35	150	165 RAHELIEAEGIEDIEK				Mascot

Gel Idx/Pos	54/C3	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1	PSA6_HUMAN	168	100	125	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1108.5535	1108.5247	-0.0288	-26	94	102 ARYEAAANWK					Mascot
1156.611	1156.6118	0.0008	1	12	21 HITIFSPEGR	21	80.892			Mascot
1156.611	1156.6118	0.0008	1	12	21 HITIFSPEGR					Mascot
1160.5986	1160.583	-0.0156	-13	22	30 LYQVEYAFK					Mascot
1285.7223	1285.7216	-0.0007	-1	31	43 AINQGGLTSVAVR	28	96.274			Mascot
1285.7223	1285.7216	-0.0007	-1	31	43 AINQGGLTSVAVR					Mascot
1933.9515	1933.9501	-0.0014	-1	4	21 GSSAGFDRHITIFSPEGR					Mascot
1979.0444	1979.052	0.0076	4	229	246 ILTEAEIDAHLVALAER	76	100			Mascot
1979.0444	1979.052	0.0076	4	229	246 ILTEAEIDAHLVALAER					Mascot
2282.2139	2282.1843	-0.0296	-13	227	246 FRILTEAEIDAHLVALAER D					Mascot

2	Transcriptional regulator ERG OS=Homo sapiens GN=ERG PE=1 SV=2	ERG_HUMAN	25	0		
---	---	-----------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1033.4619	1033.4578	-0.0041	-4	348	356 MTDPEVAR					Mascot
1049.4568	1049.4623	0.0055	5	87	96 NSPDECSVAK					Mascot
1393.7482	1393.7283	-0.0199	-14	218	229 ALQNSPRLMHAR					Mascot
1990.9116	1990.9664	0.0548	28	418	434 YPSDLPYMGSYHAHPQK					Mascot
1993.0073	1993.0643	0.057	29	54	70 MSRPVPQQDWLSQPPA R					Mascot
2301.147	2301.1628	0.0158	7	290	309 TEDQRPQLDPYQLGPTS SR					Mascot

Gel Idx/Pos	55/C4	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Proteasome subunit alpha type-6 OS=Homo sapiens GN=PSMA6 PE=1 SV=1	PSA6_HUMAN	116	100	79	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1108.5535	1108.54	-0.0135	-12	94	102 ARYEAAANWK				Mascot
1156.611	1156.6171	0.0061	5	12	21 HITIFSPGGR	4	0		Mascot
1156.611	1156.6171	0.0061	5	12	21 HITIFSPGGR				Mascot
1160.5986	1160.5895	-0.0091	-8	22	30 LYQVEYAFK				Mascot
1285.7223	1285.7284	0.0061	5	31	43 AINQGGLTSVAVR	8	0		Mascot
1285.7223	1285.7284	0.0061	5	31	43 AINQGGLTSVAVR				Mascot
1933.9515	1933.9705	0.019	10	4	21 GSSAGFDRHITIFSPGGR				Mascot
1979.0444	1979.0619	0.0175	9	229	246 ILTEAEIDAHLVALAERD	67	100		Mascot
1979.0444	1979.0619	0.0175	9	229	246 ILTEAEIDAHLVALAERD				Mascot

2	Ecotoderm-neural cortex protein 2 OS=Homo sapiens GN=KLHL25 PE=1 SV=1	ENC2_HUMAN	26	0
---	--	------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1045.5085	1045.4797	-0.0288	-29	1	9 MSVSVHETR				Mascot
1154.5325	1154.557	0.0245	21	181	190 QSEDFNLSK				Mascot
1156.5898	1156.6171	0.0273	24	163	170 RLYEFSWR				Mascot
1156.5898	1156.6171	0.0273	24	163	170 RLYEFSWR				Mascot
1285.6971	1285.7284	0.0313	24	2	12 SVSVHETRKSR				Mascot
1285.6971	1285.7284	0.0313	24	2	12 SVSVHETRKSR				Mascot
1933.0034	1933.0057	0.0023	1	292	309 KAGHTLLILGGQTFMCDK				Mascot
1990.9619	1990.9683	0.0064	3	521	539 IGDMTAKRMSCHALASG NK				Mascot

Gel Idx/Pos	56/C5	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens GN=EIF6 PE=1 SV=1	IF6_HUMAN	232	100	179	100

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1142.6165	1142.6158	-0.0007	-1	86	95 NSLPDVTQIR	43	99.829		Mascot
1142.6165	1142.6158	-0.0007	-1	86	95 NSLPDVTQIR				Mascot
1298.7175	1298.7104	-0.0071	-5	86	96 NSLPDVTQIRR				Mascot
1518.7581	1518.7596	0.0015	1	224	237 LNEAQPSTIATSMR				Mascot
2085.0835	2085.0857	0.0122	6	68	85 HGLLVPNINTDQELQHIR	72	100		Mascot
2085.0835	2085.0857	0.0122	6	68	85 HGLLVPNINTDQELQHIR				Mascot
2363.1758	2363.1724	-0.0034	-1	224	245 LNEAQPSTIATSMRDSLI				Mascot
					DSLT				
2584.3464	2584.363	0.0166	6	165	188 TSIEDQDELSSLLQVPLV	64	99.998		Mascot
					AGTVNR				
2584.3464	2584.363	0.0166	6	165	188 TSIEDQDELSSLLQVPLV				Mascot
					AGTVNR				

2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6 OS=Homo sapiens GN=PSMD6 PE=1 SV=1	PSMD6_HUMAN	30	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1475.7125	1475.7493	0.0368	25	164	176 AKSLIEEGGDWDR				Mascot
2300.0833	2300.1638	0.0805	35	94	113 NLGESEIRDAMMAKAEYL				Mascot
					CR				
2544.3779	2544.2808	-0.0971	-38	2	23 PLENLEEGLPKNPDLRI				Mascot
					AQLR				
2566.3557	2566.3384	-0.0173	-7	24	46 FLLSLPEHRGDAAVRDEL				Mascot
					MAAVR				
2703.4578	2703.3645	-0.0933	-35	138	159 LDIVFYLLRIGLFYMDNDL				Mascot
					ITR				

Gel Idx/Pos	57/C6	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1	Eukaryotic translation initiation factor 6 OS=Homo sapiens GN=EIF6 PE=1 SV=1	IF6_HUMAN	162	100	109	100
---	--	-----------	-----	-----	-----	-----

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1142.6165	1142.614	-0.0025	-2	86	95 NSLPDVTQIR	29	96.32			Mascot
1142.6165	1142.614	-0.0025	-2	86	95 NSLPDVTQIR					Mascot
1298.7175	1298.7075	-0.01	-8	86	96 NSLPDVTQIRR					Mascot
1518.7581	1518.7583	0.0002	0	224	237 LNEAQPSTIATSMR					Mascot
2085.0835	2085.0823	0.0088	4	68	85 HGLLVPNNTDQELQHIR	80	100			Mascot
2085.0835	2085.0823	0.0088	4	68	85 HGLLVPNNTDQELQHIR					Mascot
2363.1758	2363.1816	0.0058	2	224	245 LNEAQPSTIATSMRDSLI					Mascot
2584.3464	2584.365	0.0186	7	165	188 TSIEDQDELSSLLQVPLV					Mascot
					AGTVNR					

2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10 OS=Homo sapiens GN=DDX10 PE=1 SV=2	DDX10_HUMAN	32	0		
---	--	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1142.6165	1142.614	-0.0025	-2	527	536 SQADKVIIEPR					Mascot
1142.6165	1142.614	-0.0025	-2	527	536 SQADKVIIEPR					Mascot
1475.7463	1475.7496	0.0033	2	325	335 EVQYLYRVFCR					Mascot
2097.0837	2097.071	-0.0127	-6	315	331 KSIVFFSSCKEVQYLYR					Mascot
2101.0559	2101.092	0.0361	17	532	549 VIEPRAPSLTNDEVEEFR					Mascot
2300.1643	2300.1543	-0.01	-4	4	24 TANSPPSGGARPDPVRSF					Mascot
					NRWK					
2584.4385	2584.365	-0.0735	-28	486	509 EVFDVSKLPIPEYALSLGL					Mascot
					AVAPR					
2705.3967	2705.373	-0.0237	-9	687	709 KITFTDEGELVQWQPM					Mascot
					QKSAIK					

Gel Idx/Pos	58/C7	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]/22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1	14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens GN=YWHAB PE=1 SV=3	1433B_HUMAN	190	100	96	100
---	---	-------------	-----	-----	----	-----

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1015.4223	1015.4222	-0.0001	0	21	29 YDDMAAAMK				Mascot
1182.5637	1182.5171	-0.0466	-39	130	140 YLSEVASGDNK				Mascot
1289.7059	1289.7045	-0.0014	-1	63	73 VISSIEQKTER	15	51.054		Mascot
1289.7059	1289.7045	-0.0014	-1	63	73 VISSIEQKTER				Mascot
1503.8641	1503.8702	0.0061	4	44	57 NLLSVAYKNVVGAR				Mascot
1598.7405	1598.7439	0.0034	2	30	43 AVTEQGHLSNEER	67	100		Mascot
1598.7405	1598.7439	0.0034	2	30	43 AVTEQGHLSNEER				Mascot
1660.8865	1660.8899	0.0034	2	63	76 VISSIEQKTERNEK				Mascot
1812.8254	1812.8336	0.0082	5	14	29 LAEQAERYDDMAAAMK				Mascot
2011.9575	2011.9755	0.018	9	12	29 AKLAEQAERYDDMAAAMK				Mascot
2159.0027	2159.0002	-0.0025	-1	196	214 TAFDEAIAELDTLNEESYK				Mascot
2487.2473	2487.2639	0.0166	7	30	51 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYK	14	44.573		Mascot
2487.2473	2487.2639	0.0166	7	30	51 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYK				Mascot
3083.5867	3083.676	0.0893	29	30	57 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGAR				Mascot
3322.571	3322.5876	0.0166	5	130	159 YLSEVASGDNKQTTVSN				Mascot
3450.6658	3450.6633	-0.0025	-1	130	160 YLSEVASGDNKQTTVSN				Mascot

2	14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens GN=YWHAZ PE=1 SV=1	1433Z_HUMAN	30	0		
---	---	-------------	----	---	--	--

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1047.3944	1047.4233	0.0289	28	19	27 YDDMAACMK				Mascot
1503.8641	1503.8702	0.0061	4	42	55 NLLSVAYKNVVGAR				Mascot
1548.7136	1548.715	0.0014	1	28	41 SVTEQGAELSNEER				Mascot
1844.7976	1844.7979	0.0003	0	12	27 LAEQAERYDDMAACMK				Mascot

Gel Idx/Pos	59/C8	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spolset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
------	--------------	---------------	---------------	-----------------------	-----------------	-------------------

1 14-3-3 protein beta/alpha OS=Homo sapiens
GN=YWHAB PE=1 SV=3

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1015.4223	1015.4451	0.0228	22	21	29 YDDMAAAMK				Mascot
1039.4989	1039.4576	-0.0413	-40	78	85 QQMGKEYR				Mascot
1108.5569	1108.5417	-0.0152	-14	161	169 EMQPTHPIR				Mascot
1182.5637	1182.5438	-0.0199	-17	130	140 YLSEVASGDNK				Mascot
1289.7059	1289.7079	0.002	2	63	73 VISSIEQKTER	29	98.448		Mascot
1289.7059	1289.7079	0.002	2	63	73 VISSIEQKTER				Mascot
1503.8641	1503.8671	0.003	2	44	57 NLLSVAYKNVVGAR				Mascot
1598.7405	1598.7448	0.0043	3	30	43 AVTEQGHLSNEER	87	100		Mascot
1598.7405	1598.7448	0.0043	3	30	43 AVTEQGHLSNEER				Mascot
1660.8865	1660.8855	0.009	5	63	76 VISSIEQKTERNEK				Mascot
1812.8254	1812.8333	0.0079	4	14	29 LAEQAERYDDMAAAMK				Mascot
2011.9575	2011.9705	0.013	6	12	29 AKLAEQAERYDDMAAAMK				Mascot
2159.0027	2159.0056	0.0029	1	196	214 TAFDEAIAELDTLNEESYK				Mascot
2487.2473	2487.2681	0.0208	8	30	51 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYK	14	57.942		Mascot
2487.2473	2487.2681	0.0208	8	30	51 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYK				Mascot
3083.5867	3083.6226	0.0359	12	30	57 AVTEQGHLSNEERNLLSVAYKNVVGAR				Mascot
3322.571	3322.6067	0.0357	11	130	159 YLSEVASGDNKQTTVSN				Mascot
3450.6658	3450.6875	0.0217	6	130	160 YLSEVASGDNKQTTVSN				Mascot
					SQQAYQEAFAISKK				

2 14-3-3 protein zeta/delta OS=Homo sapiens
GN=YWHAZ PE=1 SV=1

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1108.5569	1108.5417	-0.0152	-14	159	167 EMQPTHPIR				Mascot
1279.6528	1279.6271	-0.0257	-20	128	139 YLAEVAAGDDKK				Mascot

Gel Idx/Pos	68/C17	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2] 22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	UMP-CMP kinase OS=Homo sapiens GN=CMKP1 PE=1 SV=3	KCY_HUMAN	112	100	19	68.46

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1206.663	1206.665	0.002	2	87	96 NKFLIDGFPR	9	0		Mascot
1206.663	1206.665	0.002	2	87	96 NKFLIDGFPR				Mascot
1216.5706	1216.5658	-0.0048	-4	97	106 NQDNLQGWNK				Mascot
1392.6642	1392.6178	-0.0464	-33	44	55 NPDSQYGELIEK				Mascot
1479.759	1479.7603	0.0013	1	27	39 YGYTHLSAGELLR	0	0		Mascot
1479.759	1479.7603	0.0013	1	27	39 YGYTHLSAGELLR				Mascot
1520.7592	1520.751	-0.0082	-5	43	55 KNPDSQYGELIEK				Mascot
1768.8639	1768.8121	-0.0518	-29	180	194 SVDEVFDEVVQIFDK				Mascot
1879.9297	1879.9376	0.0079	4	27	42 YGYTHLSAGELLRDER	9	0		Mascot
1879.9297	1879.9376	0.0079	4	27	42 YGYTHLSAGELLRDER				Mascot
1949.0491	1949.0798	0.0307	16	23	39 IVEKYGYTHLSAGELLR				Mascot
1954.928	1954.9156	-0.0124	-6	180	196 SVDEVFDEVVQIFDKEG				Mascot
2349.2197	2349.2122	-0.0075	-3	23	42 IVEKYGYTHLSAGELLRDER				Mascot
2597.3894	2597.3157	-0.0737	-28	152	173 IQTYLQSTKPIIDLYEEMG KVK				Mascot

2	Coiled-coil domain-containing protein 144A OS=Homo sapiens GN=CCDC144A PE=1 SV=1	C144A_HUMAN	31	0
---	--	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank Result Type
1008.4189	1008.4547	0.0358	36	526	533 DVEEEMEK				Mascot
1010.4281	1010.4489	0.0208	21	1113	1120 MDQCEKEK				Mascot
1020.4666	1020.4445	-0.0221	-22	248	256 TSQEPENAK				Mascot
1031.4939	1031.4589	-0.035	-34	239	247 GCENKQPQK				Mascot
1033.4697	1033.4534	-0.0163	-16	420	428 NFHNDASTK				Mascot
1038.4343	1038.4387	0.0044	4	1111	1118 ERMDQCEK				Mascot
1479.7802	1479.7603	-0.0199	-13	1030	1041 KYIAKQESVEER				Mascot

Gel Idx/Pos	69/C18	Instr./Gel Origin	dqn075dq/spotset tiago ciimar	Process Status	Analysis Succeeded
Plate #/Name	[2]22	Instrument Sample Name		Spectra	4

Rank	Protein Name	Accession No.	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %
1	UMP-CMP kinase OS=Homo sapiens GN=CMKP1 PE=1 SV=3	KCY_HUMAN	66	99.512	12	0

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1206.663	1206.6644	0.0014	1	87	96 NKFLIDGFPR					Mascot
1206.663	1206.6644	0.0014	1	87	96 NKFLIDGFPR					Mascot
1216.5706	1216.5438	-0.0268	-22	97	106 NQDNLQGWNK					Mascot
1479.759	1479.7726	0.0136	9	27	39 YGYTHLSAGELLR					Mascot
1479.759	1479.7726	0.0136	9	27	39 YGYTHLSAGELLR					Mascot
1520.7592	1520.7456	-0.0136	-9	43	55 KNPSQYGELEIK					Mascot
1879.9297	1879.9288	-0.0009	0	27	42 YGYTHLSAGELLRDER	12	0			Mascot
1879.9297	1879.9288	-0.0009	0	27	42 YGYTHLSAGELLRDER					Mascot
1954.928	1954.9115	-0.0165	-8	180	196 SVDEVFDEVVQIFDKEG					Mascot
2349.2197	2349.207	-0.0127	-5	23	42 IVEKYGYTHLSAGELLRDER					Mascot

2	Coiled-coil domain-containing protein 144A OS=Homo sapiens GN=CCDC144A PE=1 SV=1	C144A_HUMAN	36	0
---	--	-------------	----	---

Peptide Information

Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Ion Score	C. I. %	Modification	Rank	Result Type
1008.4189	1008.4501	0.0312	31	526	533 DVEEEMEK					Mascot
1020.4666	1020.4377	-0.0289	-28	248	256 TSQEPIMAK					Mascot
1021.4883	1021.4664	-0.0219	-21	1	9 MASWGGKEKR					Mascot
1033.4697	1033.455	-0.0147	-14	420	428 NFHNDASTK					Mascot
1038.4343	1038.4468	0.0125	12	1111	1118 ERMDQCEK					Mascot
1050.4885	1050.4712	-0.0173	-16	1006	1014 DLSQTQCQK					Mascot
1479.7802	1479.7726	-0.0076	-5	1030	1041 KYIAKQESVEER					Mascot
1479.7802	1479.7726	-0.0076	-5	1030	1041 KYIAKQESVEER					Mascot
1520.734	1520.7456	0.0116	8	1069	1082 TSSTIQDQFHSAK					Mascot
1782.8574	1782.7861	-0.0713	-40	275	288 SEEMWIEQKLEWK					Mascot
1851.9369	1851.8806	-0.0563	-30	1237	1252 EDNTTSIKTOMELTIK					Mascot